

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Satu Pešíčková (Peřinová)

*LUPUSOVÁ NEFRITIDA-
NOVÉ DIAGNOSTICKÉ A TERAPEUTICKÉ POSTUPY*

*Lupus nephritis-
novel diagnostic and therapeutic approaches*

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc., MBA

Konzultant: prof. MUDr. Romana Ryšavá, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem řádně uvedl/a a citoval/a všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 31.05.2014

Satu Pešíčková

Identifikační záznam:

Pro tvorbu identifikačního záznamu se řiďte normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.

PEŠIČKOVÁ, Satu. *Lupusová nefritida- nové diagnostické a terapeutické postupy. [Lupus nephritis- novel diagnostic and therapeutic approaches]*. Praha, 2014. 82s., počet příloh 2. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika Nefrologie. Vedoucí závěrečné práce Tesař, Vladimír.

Poděkování

Nejprve bych ráda poděkovala za cenné rady, pomoc, podporu a vytvoření pracovních podmínek pro studium svým školitelům profesoru Vladimírovi Tesařovi a profesorce Romaně Ryšavé. Velké poděkování náleží rovněž mému prvnímu školiteli profesoru Ctiborovi Dostálovi, in memoriam.

Dále bych chtěla poděkovat svým spolupracovníkům, kteří se podíleli na projektu, jež je podkladem první části této disertační práce. A to zejména MUDr. Martinovi Leníčkoví, který mi rovněž byl velmi nápomocen i při tvorbě této disertační práce, byl mi rádcem a přítelem. Ráda bych poděkovala profesoru Liborovi Vítkoví a pracovišti ÚLBLD za podporu naší studie. Poděkování patří MUDr. Jakubovi Závadovi za pomoc při projektu jež je základem druhé části disertace a všem klinickým pracovištím, která se do projektu zapojila. Chtěla bych poděkovat profesoru Pavlovi Horákovi a pracovníkům imunologické laboratoře ve FN Olomouc za spolupráci při stanovování imunologických parametrů.

Dále bych chtěla poděkovat všem svým kolegům z Kliniky Nefrologie VFN a 1.LFUK za spolupráci, zejména pak MUDr. Zdence Hruškové za cenné rady při tvorbě prezentací a publikací.

Ráda bych poděkovala docentce Evě Honsové za překlasifikování renálních biopsií dle současných kritérií a za poskytnutí histologických snímků použitých v této disertaci.

Velký dík patří též profesoru Martenovi Trendelenburgovi a MUDr. Elišce Potlukové za cenné konzultace týkající se našeho výzkumu.

Naše práce vznikly za podpory grantů České nefrologické společnosti 2008/01 a IGA MZ ČR 8444-3.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem pacientům a zdravým dobrovolníkům, bez nichž by tato práce nevznikla.

Největší poděkování patří celé mé rodině, zejména však manželovi Václavovi a synům Patrikovi a Erikovi, za nezměrnou trpělivost, podporu a povzbuzování.

Obsah

Seznam zkratk	7
Abstrakt	9
1. Úvod	11
1.1 Postižení ledvin u SLE	13
1.1.1. Histologické nálezy u proliferativních forem lupusové nefritidy	14
1.1.1.1. Imunofluorescence	14
1.1.1.2. Světelná mikroskopie	14
1.1.1.3. Elektronová mikroskopie	15
1.2 Vybrané protilátky u lupusové nefritidy	16
1.2.1. Protilátky proti dvojšroubovici DNA (anti-dsDNA)	16
1.2.1.1. Patogeneze	16
1.2.1.2. Klinické asociace	18
1.2.1.3. Techniky stanovení anti-dsDNA protilátek	19
1.2.1.3.1. Farrova radioimunoanalýza (RIA)	19
1.2.1.3.2. Nepřímé imunofluorescenční vyšetření za použití Crithidia luciliae (CLIFT)	19
1.2.1.3.3. Enzymová imunoanalýza (ELISA)	19
1.2.2. Role komplementu v patogenezi SLE	20
1.2.3. Protilátky proti C1q (anti-C1q)	22
1.2.3.1. Prevalence anti-C1q	23
1.2.4. CRP, mCRP a protilátky proti mCRP (anti-mCRP)	25
1.3. Standardní terapie proliferativních forem lupusové nefritidy	27
1.3.1. Cyklofosfamid (CFA)	27
1.3.2. Cyklosporin A	28
1.3.3. Mykofenolát Mofetil (MMF)	28
2. Hypotézy a cíle práce	30
2.1. Hypotézy	30
2.2. Cíle	30
3. Anti-mCRP protilátky u pacientů s lupusovou nefritidou-1.část práce	32
3.1. Pacienti a metody	32
3.1.1. Pacienti	32
3.1.2. Definice	34
3.1.3. Stanovení anti-mCRP protilátek	35
3.1.4. Stanovení dalších parametrů	36
3.1.5. Statistické zpracování	36
3.2. Výsledky	37
3.2.1 Anti-mCRP jako marker aktivity LN a SLE, 1.část	37
3.2.1.1. Koncentrace anti-mCRP u zdravé populace	37
3.2.1.2. Hladiny anti-mCRP u pacientů s aktivitou onemocnění	38

3.2.1.3. Vztah mezi hladinami anti-mCRP a proteiny akutní fáze	39
3.2.1.4 Vztah mezi anti-mCRP a jinými protilátkami typickými pro SLE a LN a komplementem	39
3.2.1.5. Hladiny anti-mCRP u jednotlivých forem LN	40
3.2.2. Anti-mCRP jako prediktor odpovědi na léčbu v dlouhodobém sledování, 2. část	41
3.2.2.1. Porovnání vstupních parametrů jednotlivých skupin	41
3.2.2.2. Výsledky po roce terapie	43
3.2.2.3. Výsledky po dvou letech terapie	44
3.2.2.4. Výstupy v dlouhodobém sledování	45
3.2.2.5. Doba dosažení odpovědi na terapii	46
3.3. Diskuze k první části práce	47
3.4. Závěr	51
4. Účinnost dlouhodobé léčby cyklosporinem A a pulsním cyklofosfamidem u nemocných s proliferativními formami lupusové nefritidy. Vliv terapie na hladiny protilátek antiC1q a antinukleosomů-2.část práce	52
4.1. Pacienti a metody	52
4.1.1. Vylučovací kritéria	52
4.1.2. Studijní protokol	53
4.1.3. Cíle studie	53
4.1.4. Definice	53
4.1.5. Klinické a laboratorní testy	54
4.1.6. Bezpečnostní kontroly	54
4.1.7. Prodloužené sledování	55
4.1.7.1. Provedená vyšetření v prodlouženém sledování	55
4.1.8. Statistické zpracování	55
4.2. Výsledky	56
4.2.1. Odpověď na terapii	57
4.2.2. Dynamika laboratorních změn v průběhu terapie	58
4.2.2.1. Vývoj renálních parametrů	58
4.2.2.2 Vývoj hladin anti-c1q a antinukleosomů	61
4.2.3. Nežádoucí účinky terapie	62
4.2.4. Prodloužené sledování	64
4.3. Diskuze k 2.části práce	66
4.4. Závěr	69
5. Použitá literatura	70
6. Publikace	82

Seznam zkratek

ACR	American College of Rheumatology
ANA	antinukleární protilátky
Anti-c1q	protilátky proti složce komplementu c1q
Anti-dsDNA	protilátky proti dvojitě vlákenné DNA (double stranded)
Anti-mCRP	protilátky proti monomeru C-reaktivního proteinu
anti-RNP	protilátky proti ribonukleovému proteinu
Anti-Sm	protilátky proti hladkým svalům (smooth muscle)
Anti-ssDNA	protilátky proti jednovláknové DNA (single stranded)
AZA	azathioprin
C4-bp	C4 binding protein
CFA	cyklofosfamid
CH doména	konstantní část H řetězce
CLIFT	nepřímé imunofluorescenční vyšetření za použití <i>Crithidia luciliae</i>
CRP	C-reaktivní protein
CyA	cyklosporin A
Fc γ	receptor pro Fc fragment imunoglobulinu G
HsCRP	high sensitivity C-reaktivní protein
ELISA	enzymová imunoanalýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
ESRD	terminální renální selhání (end stage renal disease)
FB	faktor B
FD	faktor D
FLH1	faktor H like protein
GFR	glomerulární filtrace
GMB	glomerulární bazální membrána
IF	imunofluorescence
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
ISN	International Society of Nephrology
i.v.	intravenózně
LN	lupusová nefritida

MASP	manózu vážící lektin asociované serinové proteazy
MBL	manózu vážící lektin (mannose binding lectin)
MCP-1	monocytární chemotaktický protein 1 (monocyte chemotactic protein 1)
mCRP	monomer C-reaktivního proteinu
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
MMF	mykofenolát mofetil
NF-ATc	jaderný faktor aktivovaných lymfocytů
PAS	periodic acid Shiff barvení
RIA	Farrova radioimunoanalýza
p.o.	perorálně
RPS	Renal Pathology Society
RTX	Rituximab
SAA	sérový amyloid A
SLE	systémový lupus erythematoses
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Activity Index
SLICC	Systemic Lupus International Collaborating Clinics
TNF	tumor nekrotizující faktor
ÚHKT	Ústav Hematologie a Krevní Transfuze
ÚLBLD	Ústav Lékařské Biochemie a Laboratorní Diagnostiky
VFN	Všeobecná Fakultní Nemocnice
WHO	World Health Organisation

Abstrakt

Klíčová slova: anti-mCRP protilátky, cyklofosfamid, cyklosporin A, lupusová nefritida, systémový lupus erythematoses

Systémový lupus erythematoses (SLE) je systémové autoimunitní onemocnění, v jehož patogenezi je klíčová produkce autoprotilátek proti vlastním jaderným a cytoplazmatickým antigenům a tvorba imunokomplexů. Protilátky proti monomeru C-reaktivního proteinu (anti-mCRP) mohou hrát roli v patogenezi lupusové nefritidy (LN). Cílem této práce bylo najít souvislost mezi hladinami anti-mCRP a aktivitou LN a odpovědí na léčbu.

Metody: Anti-mCRP protilátky byly stanoveny u 57 pacientů s biopticky prokázanou LN (M/Ž 10/47, medián věku 32), 29 pacientů bylo vyšetřeno v době diagnózy a dále sledováno po medián 5,9 let. Anti-mCRP byly stanovovány in house ELISA metodou, aktivita onemocnění byla hodnocena skórem SLEDAI.

Výsledky: Hladiny anti-mCRP byly vyšší u pacientů s aktivitou LN (26,78 vs 7,5 AU; $p=0,009$), korelovaly s celkovou aktivitou onemocnění SLE ($rs=0,406$, $p=0,002$). Zjištěna byla souvislost těchto protilátek s horší odpovědí po dvou letech terapie, OR (95% CI)=13,7 (1,22-770,87); $p=0,014$.

Závěr: Přítomnost sérových anti-mCRP by mohla být užitečným markrem aktivity onemocnění a prediktorem dlouhodobé odpovědi na standardní léčbu.

V druhé části práce byla porovnávána standardní léčba proliferativní LN cyklofosfamidem (CFA) s terapií cyklosporinem A (CyA).

Metody: Randomizováno bylo 40 pacientů (M/Ž 11/29, průměrný věk 29 let) s proliferativní LN k léčebnému režimu na bázi CFA či CyA. Primárním cílem bylo dosažení renální remise na konci indukční a udržovací fáze.

Výsledky: V klinické studii srovnávající efekt terapie CFA a CyA nebyl statisticky významný rozdíl mezi skupinami v dosažení remise, či odpovědi na léčbu na konci indukční i udržovací fáze, ani v době přežití bez relapsu. Léčba CyA vedla k přechodnému vzestupu krevního tlaku a reverzibilnímu poklesu glomerulární filtrace.

Závěr: CyA měl podobnou účinnost jako cyklofosfamid v sekvenční indukční a udržovací léčbě.

Abstract

Key words: anti-mCRP antibodies, cyclophosphamide, cyclosporine A, lupus nephritis, systemic lupus erythematosus

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease. Circulating autoantibodies against the body's own nuclear and cytoplasmic structures and creation of immune complexes play a key role in the pathogenesis of SLE. Antibodies against monomeric C-reactive protein (anti-mCRP) might play role in pathogenesis of lupus nephritis (LN). The aim of this study was to find relation between anti-mCRP and activity of LN and response to therapy.

Methods: The study was performed on 57 patients (M/F 0.21, median age 32 years) with LN. In a subanalysis, we focused on 29 patients with newly diagnosed active LN and we followed them up for a median of 5.9 years. Levels of anti-CRP were measured by in house ELISA. Disease activity was measured by SLEDAI.

Results: Levels of anti-mCRP were significantly higher in patients with active lupus nephritis (26.78 versus 7.5 AU, $p=0.009$) and levels of anti-mCRP positively correlated with the activity of SLE as assessed by the SLEDAI score (Spearman's $r=0.406$, $p=0.002$). We found negative prediction of anti-mCRP for worse outcome after two years of standard therapy, OR (95% CI)=13.7 (1.22-770.87); $p=0.014$.

Conclusion: Serum levels of anti-mCRP seem to be a useful laboratory marker of LN/SLE activity and a predictor of worse outcome after standard treatment.

In the second part, we compared treatment with cyclophosphamide (CYC) to Cyclosporine A (CyA) in proliferative LN.

Methods: Forty patients (M/F 0,38, mean age 29 years) with clinically active proliferative LN were randomly assigned to one of two sequential induction and maintenance treatment regimens based either on CYC or CyA. The primary outcomes were complete renal remission or response at the end of induction phase maintenance phase.

Results: In this clinical study comparing two sequential therapies there was no difference between the groups in reaching remission or response to therapy. CyA was associated with a reversible increase in blood pressure and decrease in glomerular filtration rate.

Conclusion: CyA was as effective as CYC in the induction and maintenance treatment in patients with proliferative lupus nephritis.

1. Úvod

Systémový lupus erythematosus (SLE) je systémové autoimunitní onemocnění, které může postihnout prakticky jakýkoliv orgán či systém, často jsou to klouby, kůže, ledviny, serózní blány, krevní systém a mozek [1-3].

SLE je nejčastěji diagnostikován mezi 20.- 40. rokem života. Ženy jsou postiženy asi 10x častěji než muži, tento fakt je dáván do souvislosti zvýšenou expozicí estrogenům [4]. Prevalence onemocnění je od 15 do 51 případů na 100 tisíc obyvatel [5, 6]. Vyšší incidence onemocnění byla pozorována u afrokaribského etnika, dále pak u asiátů a nejméně často bývají postiženi Kavkazané [7].

Základním patogenetickým mechanismem působícím u SLE je produkce autoprotilátek proti vlastním jaderným a cytoplazmatickým antigenům a tvorba imunokomplexů [8, 9]. Nicméně primární příčina této dysregulace není dosud známá, v poslední době několik studií poukazuje na spojitost s defektním odstraňováním apoptotických buněk [10, 11].

Na vzniku onemocnění se mohou podílet genetické faktory, které jsou spojovány se zvýšeným výskytem SLE v určitých rodinách [12]. U jednovaječných dvojčat byla pozorována 25% pravděpodobnost postižení i druhého dvojčete [13].

Onemocnění SLE je pozorováno častěji u pacientů s vrozenými imunodeficiencemi, zejména onemocnění spojených s nedostatkem určitých komponent komplementu (např. deficience C1q esterázy a C2 deficience), které následně způsobují hromadění imunokomplexů v důsledku neschopnosti organismu je odstranit [14-16]. SLE se v důsledku těchto vrozených deficiencí projevuje v časnějším věku [16].

Recentně byla publikována nová (modifikovaná) kritéria pro stanovení diagnózy SLE, připravena skupinou SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics), uvedena jsou v tabulce č.1. Toto onemocnění může být diagnostikováno u osob splňujících minimálně 4 kritéria (z toho alespoň jedno imunologické a jedno klinické) či biopticky potvrzenou lupusovou nefritidu (LN) a jedno imunologické kritérium [17].

Klinická kritéria	
1. Akutní kožní lupus	exantém na tvářích (nepočítá se, pokud je zároveň diskoidní lupus na tvářích), bulózní lupus, lupusová toxická epidermální nekrolýza, lupusový makulopapulozní exantém, fotosenzitivita nebo subakutní kožní lupus
2. Chronický kožní lupus	Diskoidní lupus (lokální či generalizovaná forma), hypertrofický (verukózní) lupus, mukózní lupus, lupusová panikulitida, diskoidní lupus/ lichen planus overlap
3. Orální či nasální ulcerace	Při absenci jiných příčin
4. Nejízvící se alopecie	Při absenci jiných příčin
5. Synovitida	Postihující 2 a více kloubů (otok a výpotek) nebo bolestivost 2 a více kloubů spojená s ranní ztuhlostí
6. Serozitida	
7. Renální	Proteinurie více než 0,5 g/den nebo hematurie
8. Neurologické	Křeče, psychóza, mononeuritis multiplex, myelitis, periferní či kraniální neuropatie, akutní zmatenost
9. Hemolytická anemie	
10. Leukopenie	<4000/mm ³ nebo lymfopenie <1000/m ³
11. Trombocytopenie	<100000/mm ³
Imunologická kritéria	
1. ANA	Pozitivita
2. Anti-dsDNA protilátky	Pozitivita
3. Anti-Sm protilátky	Pozitivita
4. Antifosfolipidové protilátky	pozitivní lupus antikoagulans nebo falešně pozitivní rychlá reaginová reakce nebo zvýšený titr antikardiolipinových protilátek (IgA, IgG nebo IgM) nebo pozitivní test na anti-β ₂ -glykoprotein I (IgA, IgM nebo IgG)
5. Hypokomplementemie	C3, C4, CH50
6. Pozitivita přímého Coombsova testu	V nepřítomnosti hemolytické anemie

Tab.1: Klinická a imunologická kritéria použitá ve SLICC klasifikaci z roku 2012, převzato z [17].

ANA, antinukleární protilátky; SLICC, Systemic Lupus International Collaborating Clinics.

1.1 Postižení ledvin u SLE

Renální postižení je pozorováno u 25-65% pacientů se SLE [18]. Přítomnost LN je jedním z nejzávažnějších orgánových postižení u SLE a je spojeno se zvýšenou morbiditou a mortalitou [19]. Klinický obraz onemocnění může být velmi rozmanitý, má tendence ke střídání období remise a relapsů, přičemž se průběh u jednotlivých pacientů velmi často liší [20].

Minimální či dokonce negativní močové nálezy nevyklučují přítomnost LN. Aktivní LN se může manifestovat proteinurií, aktivním močovým sedimentem i akutním renálním selháním [21]. Včasná diagnostika a léčba lupusové nefritidy je důležitá, neboť časná odpověď na léčbu je spojena s lepší prognózou [22].

Klasifikace LN prošla v průběhu let několika úpravami. Původní klasifikace z roku 1975 zaštitěná WHO (World Health Organisation) [23], revidována v r. 1982 [24], byla nověji nahrazena klasifikací z roku 2003, která vznikla konsensem mezi mezinárodní nefrologickou společností ISN (International Society of Nephrology) a renální patologickou společností RPS (Renal Pathology Society) [25]. Toto nejnovější členění LN je zobrazeno v tabulce č. 2. Současná klasifikace zohledňuje fokální postižení (postiženo <50 % všech glomerulů) a difuzní (postiženo >50 % všech glomerulů), dále pak posuzuje postižení segmentální (<50 % jednotlivého glomerulu) a globální (postiženo >50 % jednotlivého glomerulu) a v neposlední řadě pak rozlišuje změny aktivní a chronické.

Třída I	Imunodepozita v mezangiu bez hypercelularity
Třída II	Mezangiální hypercelularita s imunodepozity
Třída III	Fokální glomerulonefritida
	A, aktivní léze
	B, aktivní a chronické léze
	C, chronické léze
Třída IV	Difuzní glomerulonefritida
	IV-S segmentální léze (A, B, C)
	IV-G globální léze (A, B, C)
Třída V	Membránózní lupusová nefritida
Třída VI	Pokročilá sklerotizující léze (>90 % glomerulů zaniklých)

Tab.2: Klasifikace dle ISN/RPS z r. 2003, převzato z [25].

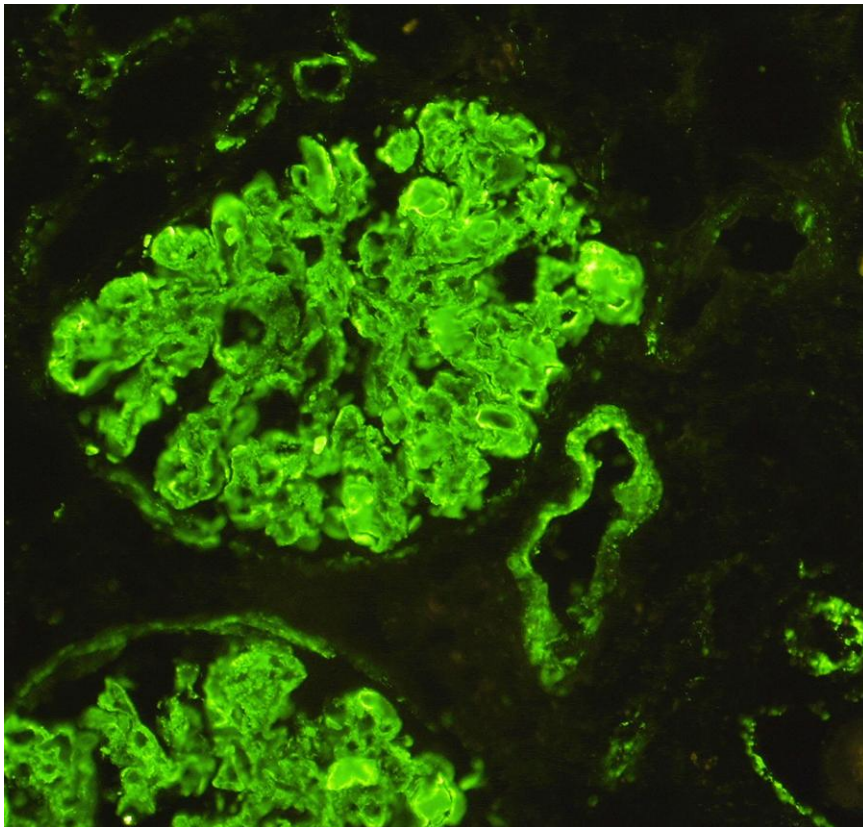
ISN, International Society of Nephrology; RPS, Renal Pathology Society.

1.1.1. Histologické nálezy u proliferativních forem lupusové nefritidy

Bioptický vzorek je posuzován specialistou na nefropatologii imunofluorescenčně, světelnou mikroskopií a případně elektronovou mikroskopií. Za dostatečně reprezentativní vzorek se považuje takový, který obsahuje minimálně 10 glomerulů.

1.1.1.1. Imunofluorescence

U LN se v mezangiu a kapilárních stěnách difuzně ukládají depozita imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM) a složky komplementu (C3, C1q, C4 a C5b-9), tato kolokalizace bývá nazývána „full house“ [26]. Viz obrázek č. 1. Protilátky jsou označeny a detekovány speciálním mikroskopem určeným pro fluorescenci.

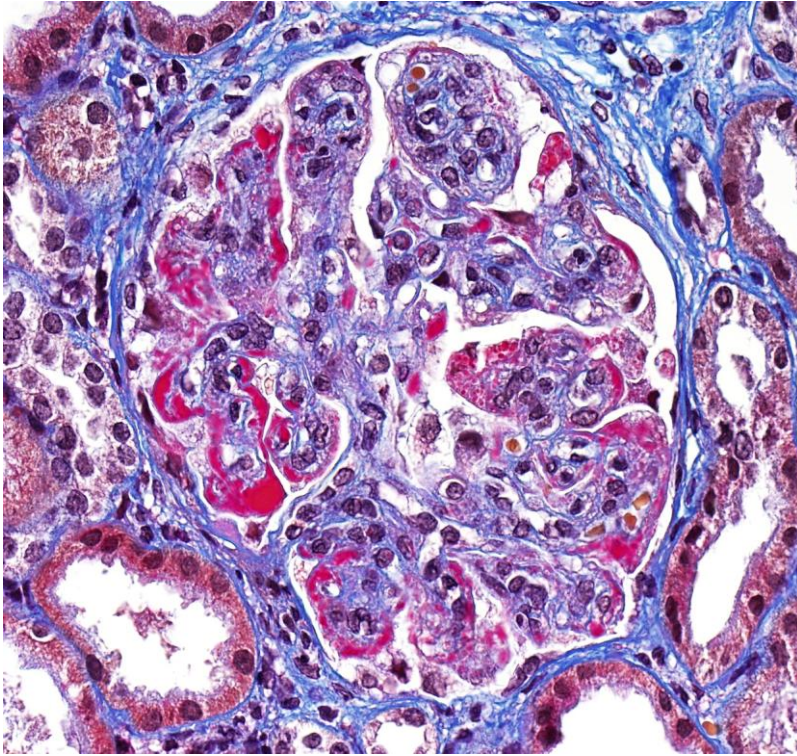


Obr. 1: Imunofluorescence, převzato z archivu doc. MUDr. E. Honsové, Ph.D., IKEM, Praha

1.1.1.2. Světelná mikroskopie

Pro světelnou mikroskopii je materiál barven hematoxylinem-eosinem, methemin-stříbrem, trichromem, PAS (periodic acid Shiff) a anilin-fuchsin-orange G. Posledně zmiňované barvení u pacienta s LN je zobrazeno na orázku č. 2. V histologických obrazech glomerulů pacientů s LN, můžeme vidět difuzní endokapilární proliferaci, globální glomerulární

hypercelularitu, epiteliální proliferaci, obraz drátěných kliček, glomerulární nekrózu (karyorhexe-přítomnost apoptotických, pyknotických a fragmentovaných jader, fibrinoidní nekrózy-fragmentace jader či ruptura glomerulární bazální membrány, hyalinní tromby-imunodepozita v kapilárách) [21, 27].



Obr. 2: metoda-barvení: Anilin-Fuchsin-Orange G, objektiv 40x, převzato z archivu doc. MUDr. E. Honsové, Ph.D., IKEM, Praha

1.1.1.3. Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie umožňuje zobrazit tkáň s vysokým rozlišením. Elektrondenzní depozita korespondují s nálezem depozit imunoglobulinů (imunofluorescence) a nálezem „drátěných kliček“ a hyalinních trombů (světelná mikroskopie). Elektrondenzní depozita mohou být spatřena v mesangiu a na obou stranách bazální membrány [27, 28].

1.2 Vybrané protilátky u lupusové nefritidy

Autoprotilátky hrají jednu z ústředních rolí v patogenezi SLE a LN. Některé jsou asociovány s aktivitou onemocnění [29]. Většina těchto protilátek je namířena proti buněčnému jádru. To, že se protilátky podílí na patogenezi LN, je někdy obtížné prokázat, je k tomu nutné zastihnout jak protilátku, tak antigen v postižené tkáni, a ideálně je porovnat s absencí tohoto nálezu u onemocnění v remisi.

Po mnoho let se pátralo po tom, proč se tvoří protilátky proti vlastním nukleárním a cytoplazmatickým strukturám, které jsou ukryty v buňce. Podle jedné z teorií dochází na povrchu buněk procházejících apoptózou k akumulaci autoantigenů, proti kterým jsou často namířeny protilátky u pacientů se SLE [30]. U pacientů se SLE je odstraňování tohoto apoptotického materiálu zbržděno [31], protražovaná expozice těchto autoantigenů může vést k ztrátě periferní tolerance.

1.2.1. Protilátky proti dvojšroubovici DNA (anti-dsDNA)

1.2.1.1. Patogeneze

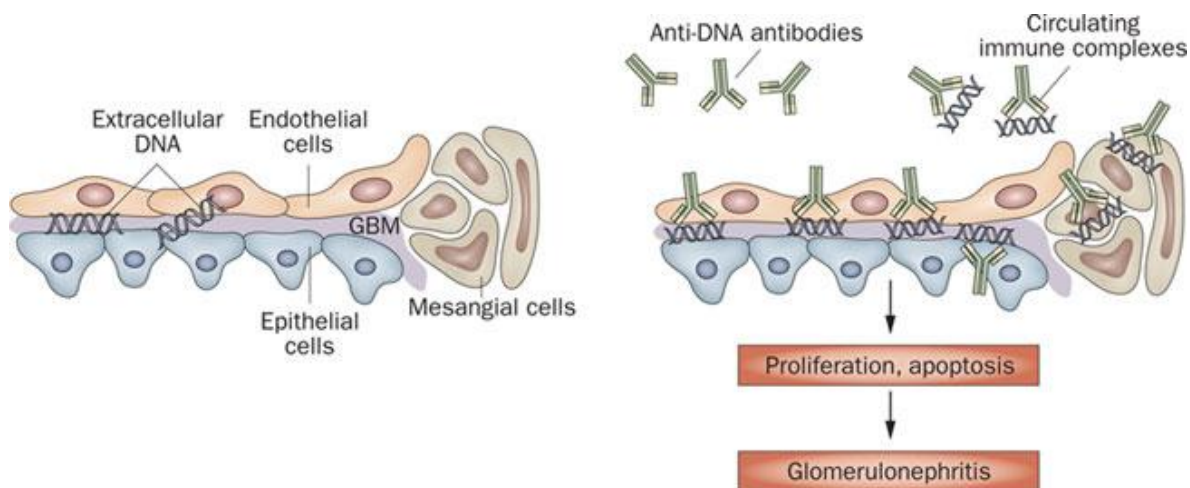
V současné době bylo publikováno nejvíce experimentálních dat o protilátkách proti dsDNA. Základním patogenetickým mechanismem, jakým dochází k poškození ledvin, je ztráta tolerance B-lymfocytů, produkce autoprotiátek a vznik imunokomplexů, ukládajících se do glomerulů [9]. U pacientů se SLE, resp. LN, je při dysregulaci apoptozy nedostatečně odklizen buněčný odpad, dochází k obnažení chromatinu, což vede k indukci tvorby autoprotiátek, zejména proti jednovláknové DNA (anti-ssDNA) a dvouvláknové DNA (anti-dsDNA), antinukleosomů [32, 33], dále pak protilátky proti hladkým svalům (anti-Sm), ribonukleovému proteinu (anti-RNP), anti-histonů, složce komplementu C1q (anti-C1q) a dalších [34]. Uvolněné nukleosomy mohou v cirkulaci aktivovat dendritické buňky, jež za pomoci mediátorů aktivují CD4⁺ T lymfocyty [35]. T-lymfocyty jsou uvolněny do cirkulace a následně pomáhají B-lymfocytům diferencovat se v buňky produkující anti-dsDNA protilátky. Anti-dsDNA protilátky interagují s fragmenty chromatinu v mezangiální matrix [36]. Mezangiální buňky exprimují Fcγ receptory, díky čemuž mohou vázat komplexy chromatin-IgG. Dochází k produkci mezangiální matrix. Zde pak imunokomplexy aktivují komplement, rozvíjí se mírnější formy LN. V druhém kroku dojde k zablokování genu pro renální DNAsyl, což se projeví jako transformace do závažnější (proliferativní) formy LN [37,

38]. Přesmykem z IgM na IgG (IgG1 a IgG3) formu anti-dsDNA, se zvyšuje patogenita protilátek [33].

Jedním z možných mechanismů rozvoje LN je tvorba imunokomplexů anti-dsDNA s DNA/nukleosomy, které byly uvolněny z apoptotických buněk, následně pak tvoří depozita v glomerulech a iniciují zánětlivou kaskádu s následným poškozením tkáně ledviny [39]. Viz obrázek č. 3. Proti této teorii svědčí minimální záchyt těchto imunokomplexů v cirkulaci [40]. U modelu myši bez autoimunity při podávání preformovaných imunokomplexů neměly tyto komplexy žádnou afinitu ke glomerulární bazální membráně [41], dokonce u SLE myši došlo k poklesu vlastní tvorby těchto protilátek, snížení aktivity nefritidy a prodloužení přežití [42]. Podle jiné teorie anti-dsDNA protilátky reagují s DNA/nukleosomy ukotvenými v glomerulární bazální membráně [43]. Tento mechanismus je rovněž zachycen na obrázku č. 3.

Poslední z teorií poukazuje na zkříženou reaktivitu mezi renálními antigeny (např. laminin, heparan sulfát, alfa-aktinin) a anti-dsDNA protilátek. Množství imunokomplexů koreluje se závažností LN. Dochází k ukládání především IgG, ale i IgA a IgM depozit, dále pak C3, C4 a C1q složek komplementu [44]. Aktivace zánětlivé kaskády je dosaženo pomocí Fc γ receptorů v makrofázích, dendritických buňkách, neutrofilech, mezangiálních buňkách a buňkách ledvin [45]. Zároveň se na ní podílí i reaktivita s nefritogenními proteiny exprimovanými v renálních parenchymových buňkách, proximálních tubulárních buňkách a mezangiálních buňkách s následným uvolněním prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-1), tumor nekrotizujícího faktoru alfa (TNF), monocytární chemotaktický protein 1 (MCP-1) [46]. Uložené imunokomplexy nemohou být fagocytovány mezangiálními buňkami a jsou deponovány v subendotelium. To za pomoci prozánětlivých cytokinů a komplementu vede k migraci a infiltraci monocytů a polymorfonukleárních buněk a následnému poškození tkáně [47].

Zajímavé je, že ne všichni pacienti s přítomností anti-dsDNA protilátek vyvinou klinický obraz renálního postižení, což poukazuje na nutnost účasti dalších přídatných faktorů [48].



Obr. 3: Schéma indukce lupusové nefritidy anti-dsDNA protilátkami.

Převzato z [49]

1.2.1.2. Klinické asociace

Tyto protilátky byly poprvé popsány již v roce 1957 [50], o pár let později bylo prokázáno u pacientů se SLE, že anti-dsDNA protilátky kolísají v závislosti na aktivitě onemocnění a stoupají před exacerbací onemocnění [51] a byla potvrzena vyšší prevalence protilátek u pacientů s aktivní LN [52]. Prevalence těchto protilátek ve velké studii s 1000 pacienty byla 78% [2]. V některých studiích korelovaly anti-dsDNA s progresí do renálního selhání [53, 54] a sníženým přežitím [55, 56]. Dokonce bylo prokázáno, že přítomnost těchto protilátek předchází diagnózu tohoto onemocnění až o několik let [57]. Zatím není jasné, zda vyšší hodnoty anti-dsDNA provázejí celý relaps onemocnění, či stoupají před aktivací a poté těsně před rozvinutím klinického obrazu flare/relapsu dojde k poklesu hladin, z důvodu konsumpce protilátek v poškozených tkáních [58]. Jinou možností by mohlo být i to, že při zvýšené proteinurii, při některých relapsech, jsou tyto protilátky vylučovány v moči pacientů [59]. Hladiny těchto protilátek je možno terapeuticky ovlivnit, při zvýšení imunosuprese došlo k poklesu hladin anti-dsDNA a sníženému množství flare/relapsů, ale za cenu nežádoucích účinků kortikosteroidů [60]. V klinické studii při léčbě anti-CD 20 protilátkou-rituximabem (RTX) došlo k poklesu jak klinické aktivity onemocnění, tak hladin anti-dsDNA [61].

1.2.1.3. Techniky stanovení anti-dsDNA protilátek

1.2.1.3.1. Farrova radioimunoanalýza (RIA)

Principem této metody je provedení separace vazané a volné DNA pomocí precipitace imunoglobulinů síranem amonným. Navázaná radioaktivní DNA precipituje s imunoglobuliny, zatímco volná DNA zůstává v supernatantu. Volná DNA prochází nitrocelulozovým filtrem, zatímco komplexy se na filtru zachytí a mohou pak být detekovány. Nejsou zachyceny protilátky s nízkou aviditou, jejichž imunokomplexy jsou disociovány v roztoku s vysokou koncentrací solí [62]. Tyto se nacházejí u pacientů s mírnějším postižením, nebo při postižení jiných orgánů, např. centrálního nervového systému [63].

1.2.1.3.2. Nepřímé imunofluorescenční vyšetření za použití *Crithidia lucilliae* (CLIFT)

Protilátky se střední až vysokou afinitou jsou zachyceny na dvojvláknovou DNA na kinetoplastu (mitochondrii) prvoka *Crithidia lucilliae*, znázorněno na obrázku č. 4. Je to metoda umožňující rozlišení izotypů [64], s vysokou specifitou, ale obtížnou kvantifikovatelností [65].



Obr 4: Pozitivní imunofluorescenční test, převzato z www.birmingham.ac.uk

1.2.1.3.3. Enzymová imunoanalýza (ELISA)

ELISA je nejčastěji používaná metoda s dobrou senzitivitou. Dostupných je více komerčních kitů pro stanovení anti-dsDNA protilátek. Touto metodou jsou zachyceny protilátky s vysokou i nízkou afinitou, zejména IgM, ale i IgG a IgA protilátek [66]. Recentně byla popsána metoda zachycující protilátky s vysokou aviditou. Na destičkách je navázán antigen

dsDNA, během inkubace se na něj naváže anti-dsDNA protilátka. Po promytí se přidá konjugát s králičími anti-humánními IgG protilátkami, které se naváže na komplexy a který je následně barevně označen [67, 68].

V porovnání s ELISA metodou, Farrova radioimunoanalýza lépe koreluje s globální aktivitou SLE, renální aktivitou a vaskulitickou aktivitou [69]. ELISA metoda má vysokou senzitivitu, ale nižší specifitu [66, 70, 71]. Proto by měla být používána jako screeningová metoda, která se při pozitivním výsledku potvrdí CLIFTem [66].

1.2.2. Role komplementu v patogenezi SLE

Komplement hraje důležitou roli v imunitní obraně organismu, je složen z proteinů nacházejících se v cirkulaci i extracelulární tekutině [72]. Hraje roli při obraně v boji proti infekčním mikroorganismům, odklízí imunokomplexy a mrtvé buňky, propojuje systém vrozené a získané imunity [73]. Komplement může být aktivován klasickou, alternativní nebo lektinovou cestou. Při aktivaci komplementu klasickou cestou je C1 první komponentou a jejím hlavním úkolem je odstraňovat imunokomplexy z tkání během apoptózy [74].

C1 je složena ze tří komponent: C1q, C1s a C1r, jež se sloučí v kalcium-dependentní makromolekulární komplex (C1qr2s2). Aktivace je započata navázáním C1q na Fc frakci IgM (CH3 doménu) nebo IgG (CH2 doménu) imunokomplexu, čímž dojde ke změně konformace C1q v její kolagenové oblasti. Tímto dojde k aktivaci C1r a následně je aktivována C1s složka a iniciace celé enzymové kaskády [75]. Kromě toho se může C1q vázat a usnadňovat odstraňování apoptotických buněk přes C1q ligandy jako je DNA [76], fosfatidylserin [77] a IgM [78]. Aktivace C1 komplexu vede k štěpení C2 a C4 složek komplementu, vznikne C4b2a, který se chová jako C3 konvertáza a ta následně štěpí a aktivuje C3 složku komplementu.

K aktivaci komplementu alternativní cestou dochází přímým kontaktem s patogenem. Alternativní cesta se aktivuje spontánně konformací C3 na hydrolyzovanou formu, s následnou vazbou na faktor B, po rozštěpení faktoru D je vytvořena iniciální C3 konvertáza. Následně je stabilizována properdinem a sama se amplifikuje a vytváří C3 konvertázu alternativní cesty (C3bBb) [73].

Lektinová cesta je zahájena vazbou MBL (mannose-binding lectin) na D-manosu nebo N-acetyl-D-glukosamin, která je součástí některých patogenů (bakterie, viry), zároveň i endogenní epitopy (např. apoptotické buňky) s následnou aktivací MBL-asociovaných

serinových proteáz (MASP-1 a MASP-2) [79]. Aktivovaná MASP-1 štěpí C4 na C4a a C4b. C4b štěpí C2 a vytváří C4b2a C3 konvertázu [80].

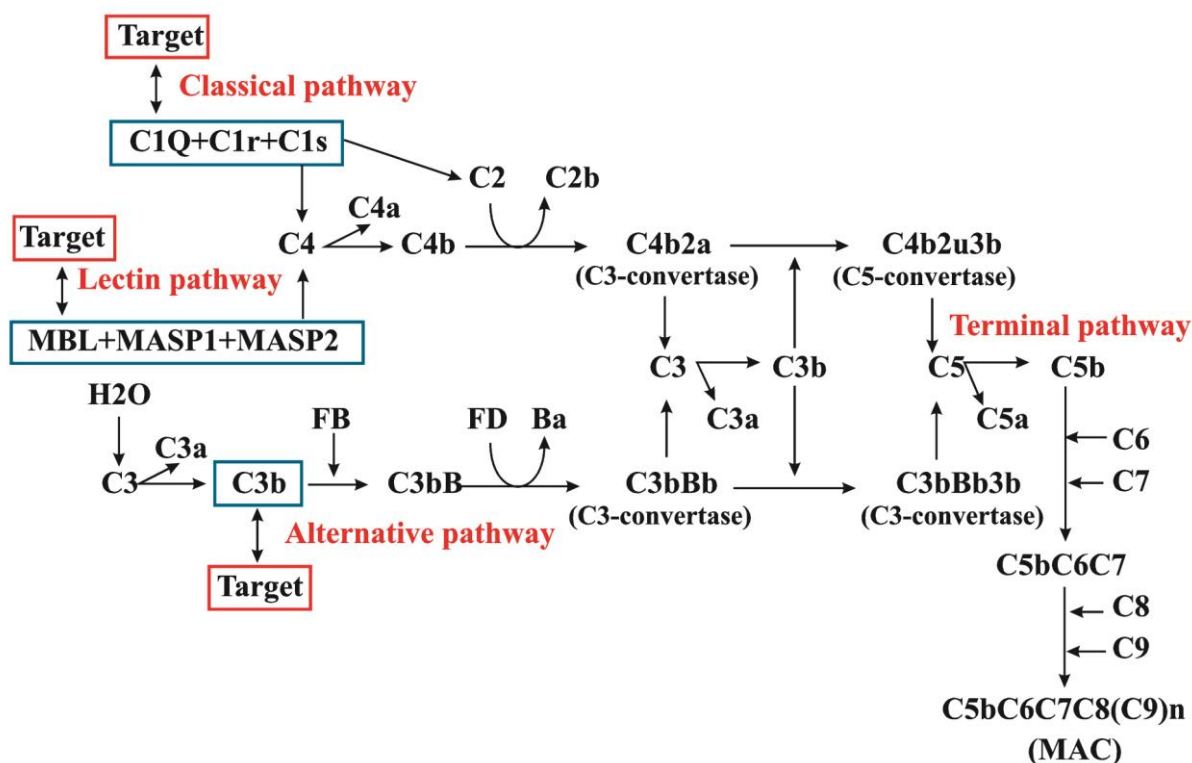
Při aktivaci komplementu jakoukoliv cestou, dochází nakonec ke štěpení C3 a C5 a vzniku C3a a C5a anafylatoxinů, C3b opsoninů a C5b-9 komplexu atakujícího membránu, viz obrázek č. 5. Následně se navazují na specifické buněčné receptory (C3aR, C5aR a CR1-4). Tyto receptory se nacházejí na neutrofilních leukocytech, makrofázích, zdá se, že jsou přítomny i na T- a B- lymfocytech, dendritických buňkách, ale i lokálně ve specifických buňkách orgánů, např. v epiteliálních buňkách glomerulu a proximálního tubulu [81, 82].

Role komplementu u pacientů se SLE je rozporná, na jednu stranu homozygotní deficiencie některých komponent predisponuje k výskytu SLE, na druhou pak byla popsána aktivace komplementu imunokomplexy v postižených tkáních. U pacientů s LN je častým nálezem C3 a C4 hypokomplementemie, je přítomna až u 90% pacientů s difuzní LN [83]. Jednou z příčin hypokomplementemie může být deplece C1q nebo dalších komponent klasické cesty [84, 85]. Několika autory byla popsána silná závislost mezi hladinou protilátek proti C1q a deplecí C1q [85-87]. Intenzivně byla studována C1q složka komplementu, jež má svou úlohu v clearance imunokomplexů a odstraňování odpadních látek pocházejících z apoptotických buněk [88].

Ze zvířecích studií vyplynulo, že C1q deficientní myš, prokazuje defektní clearance apoptotických buněk makrofágy [89], dochází u nich k akumulaci apoptotických částic a imunokomplexů v ledvině [90], navíc se urychlují autoimunitní procesy [91]. Clearance apoptotického materiálu cestou C1q následně reguluje rozvoj autoreaktivních B1-lymfocytů a protilátek proti intracelulárním proteinům [92]. V myších modelech C1q ovlivňuje jak hepatální příjem, tak i zpracování imunokomplexů [93]. C1q deficiencie je u lidí asociována s vyšší prevalencí tzv. lupus-like syndromu [94-96]. Překvapivé je, že homozygotní C3 deficiencie není spojena s vyšším výskytem SLE [96].

V *in vitro* studiích bylo ukázáno, že se globulární část C1q váže přímo na apoptotické části keratinocytů, vaskulárních endotheliálních buněk a lymfocyty [97]. *In vivo* bylo popsáno, že C1q se váže na povrch mikropartikulí v krevním řečišti [98].

Při vazbě na imunokomplexy či apoptotická tělesa, odhaluje C1q neoepitopy, které při prodloužené expozici mohou vést k imunitní odpovědi proti vlastním strukturám a v souvislosti s tím k alteraci funkce komplementu [99].



Obr.5: Cesty aktivace komplementu, převzato z [100],

MBL, manózu vážící lektin;; MASP, MBL asociovaná serinová proteáza 1 a 2; FD, faktor D; FB, faktor B; MAC, komplex atakující membránu.

1.2.3. Protilátky proti C1q (anti-C1q)

C1q je molekula skládající se z kolagenní části končící globulárními hlavami (viz obrázek 6). Imunokomplexy se váží na globulární části a anti-C1q protilátky na kolagenní část molekuly. Vazba na C1q se projeví jen, pokud je navázána na solidní struktury tkání, zřejmě po změně konformace a odhalení neoepitopů, které po vazbě následuje. U pacientů s LN dominují protilátky IgG2 podtřídy [101]. Tyto protilátky byly nalezeny v biotických nálezech z ledvin pacientů s lupusovou nefritidou, kde byl 50x vyšší poměr anti-C1q/IgG v glomerulárním extraktu než v séru [102].

V experimentální studii Trouwa a kol. [103] byla normálním (BALB-c) myším podána murinní monoklonální protilátka proti C1q, což následně vedlo k depleci C1q v cirkulaci a ukládání C1q a anti-C1q v glomerulární bazální membráně, ale bez průkazu většího glomerulárního poškození. Poté u těchto myší k zmíněné protilátce přidali ještě subnephritogenní dávku komplement fixační anti-murinní GBM protilátky, která se

zřejmě navázala v ledvině, a na ní se navázala C1q a anti-C1q, následně došlo k velkému přílivu granulocytů a rozvoji velké proteinurie [103]. K tomuto poškození nedošlo u myši s C1q, C3 a C4 deficiencí, lze tedy předpokládat, že se anti-C1q protilátky uplatňují pouze v kontextu imunokomplexových glomerulonefritid, jako je např. LN.

Zdá se, že anti-C1q ovlivňují aktivaci klasické cesty komplementu pouze nepřímo [104].

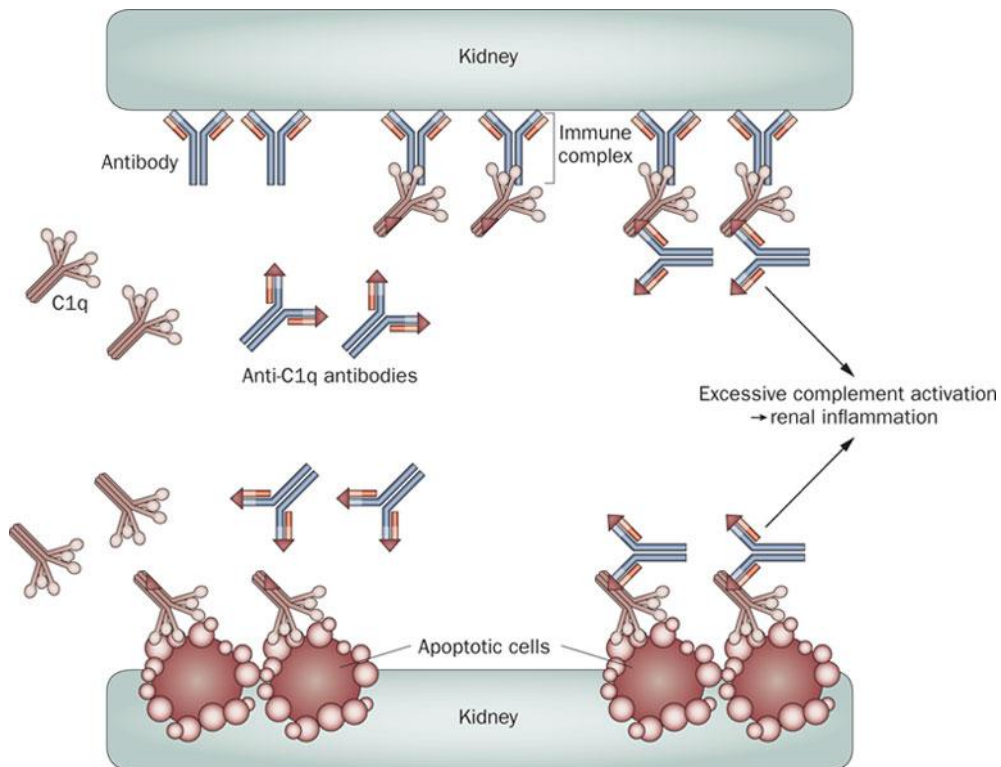
Jednou z možností patogenického působení anti-C1q by mohlo být vyvázáním C1q složky komplementu z cirkulace, načež by došlo k hromadění apoptotických buněk, exprimujících autoantigeny na svém povrchu s následným rozvojem autoimunity [105].

U pacientů s LN třídy III a IV byla zjištěna vyšší infiltrace dendritických buněk v ledvině [106]. Tyto dendritické buňky mohou generovat odpověď proti vlastním antigenům apoptotických buněk, zprostředkovanou B- a T-lymfocyty [11].

1.2.3.1. Prevalence anti-C1q

Protilátky proti C1q byly poprvé popsány u pacientů se SLE v roce 1984 [107]. Tyto protilátky byly nalezeny i u pacientů s jinými autoimunitními onemocněními [108, 109].

Anti-C1q korelují s aktivitou LN, zejména u proliferativních forem [110-113], kde byly nalezeny v glomerulární bazální membráně [102]. Vyšší prevalence těchto protilátek je u pacientů s aktivní nefritidou [74]. Vzestup anti-C1q predikuje renální relaps [114, 115], po terapii dochází k jejich poklesu [111]. Ve studii Trendelenburga a kol. [111] vyšla vysoká prediktivní hodnota negativního výsledku, z čehož vyplývá, že negativní test na anti-C1q téměř vylučuje aktivní proliferativní LN.



Obr.6: Imunokomplexy (horní část obrázku) a apoptotické buňky (dolní část) nabídnou vazebná místa pro C1q, které po navázání změny konformaci a odhalí epitopy, jež jsou odhaleny anti-C1q protilátkami, následuje amplifikovaná aktivace komplementu s následným rozvojem renálního zánětu. Převzato z [113].

Ke stanovení anti-C1q se používá nyní již běžně dostupná ELISA metoda, kde se využívá C1q jako antigen. Konformační změny molekuly je dosaženo vazbou globulárních hlav C1q na destičky. Aby nedošlo k vázání imunokomplexů, jež mají pouze nízkou afinitu k C1q, je využito pufru [88].

1.2.4. CRP, mCRP a protilátky proti mCRP (anti-mCRP)

C-reaktivní protein (CRP) je pentamer skládající se z 5 identických podjednotek o molekulové váze 23 kDa [116]. Úlohou CRP je odstraňování imunokomplexů a clearance apoptotického materiálu retikuloendoteliálním systémem [117]. CRP se váže na povrch poškozených buněk organismu. Následně se pomocí C1q aktivuje klasická cesta komplementu, CRP rovněž podporuje opsonizaci těchto buněk C3b složkou komplementu, poté díky vazbě na specifické receptory dochází k fagocytóze [118, 119].

Mnoho pacientů s aktivním SLE (s výjimkou serositidy) má nízké hladiny CRP [120]. Tyto hladiny však mohou stoupat v reakci na bakteriální infekci [120-122]. Je možné, že v důsledku snížených hladin CRP při aktivitě SLE dochází k nedostatečné vazbě na apoptotický materiál, a tím pádem se zvyšuje riziko abnormální imunizace autoantigeny a rozvoj autoimunity [123]. Nízké hodnoty CRP jsou zejména u pacientů s hypokomplementemií při postižení ledvin, podle jedné z hypotéz by se mohlo jednat i o konzumaci CRP imunokomplexy [124], pročež svědčí i některé serologické nálezy [125]. Polymorfismus v oblasti genu pro CRP predisponuje ke vzniku SLE [126].

Za specifických podmínek (alterace pH, urémie, hypokalcémie) CRP ireverzibilně disociuje na monomery (mCRP) a tím odhalí nové epitopy [117].

Předpokládá se, že mCRP hraje roli v indukci sekrece IL-8 neutrofilů a tím potlačuje apoptózu [127]. Dále pak zvyšuje hladinu receptoru pro C3 (CD11b/CD 18) [128]. V kyselém prostředí se váže na IgG část imunokomplexů a tím může zřejmě hrát roli v jejich odstraňování [129]. Protilátky proti mCRP (anti-mCRP) se váží na nízko-afinitní receptory-FcγRIIIb (CD16) [130]. U myši (apolipoprotein knockout mice) mCRP, narozdíl od CRP, snižuje rozvoj aterosklerózy [131]. Podobně jako CRP může mCRP hrát roli v aktivaci komplementu klasickou cestou [132].

mCRP navázané na povrchu nekrotických buněk přitahuje složky komplementu, aktivuje jak klasickou cestu via C1q a C4-bp (binding protein), zároveň i blokuje alternativní cestu pomocí regulátorů faktoru H a FLH1 (faktor H-like protein) [133, 134]. mCRP se váže na kolagenní část C1q [134], a zdá se, že významně podporuje fagocytózu buněk v pozdní fázi apoptózy [134].

Recentně bylo publikováno, že IgG protilátky anti-mCRP mohou participovat v patogenezi SLE a LN [135, 136]. Anti-mCRP protilátky rozpoznají podjednotky CRP, ale ne nativní pentamerovou formu [137]. Tyto protilátky se pravděpodobně váží na mCRP navázané na

povrchu tkání [138], např. cévách, játrech, kosterních svalech a ledvině [139-141]. Tyto nálezy podporuje i to, že anti-mCRP nekoreluje s hladinami cirkulujícího CRP [138, 142].

Anti-mCRP mohou inhibovat vazbu mCRP na C1q či H faktor a tím snižovat clearance apoptotických buněk u pacientů s LN [134].

Bellová a kolegové [117] popsali vysokou prevalenci těchto protilátek u pacientů se SLE. Další autoři je našli u nemocných s antifosfolipidovým syndromem, a to jak idiopatickým, tak asociovaným se SLE [143], popsány byly i u pacientů s aktivitou lupusové nefritidy [135, 143]. Jiná studie s opakovanými renálními biopsiemi prokázala korelaci mezi anti-mCRP a indexem aktivity [142], navíc pacienti s pozitivitou anti-mCRP hůře odpověděli na léčbu [135]. V renálních biopsiích pacientů s LN byla popsána v subendoteliálním prostoru a glomerulární bazální membráně kolokalizace IgG protilátek s mCRP, C1q a dsDNA [144]. Jiná skupina autorů tyto nálezy potvrdila a zároveň nebylo CRP při imunofluorescenčním vyšetření zachyceno u pacientů s jinými proliferativními nefritidami ani u zdravých kontrol [145]. Nakahara a kol. [146] však CRP depozita našla, jak u pacientů se LN, tak i u pacientů s IgA nefropatií.

Tyto protilátky nejsou zatím stanovovány rutinně, pouze in-house ELISA metodou, metodika se mírně liší dle jednotlivých laboratoří, kde byl výzkum prováděn [117, 143, 147]. V naší práci jsme mírně modifikovali metodu dle Sjowalla [147].

1.3. Standardní terapie proliferativních forem lupusové nefritidy

Proliferativní formy LN (typ III a IV) jsou závažným postižením ledvin při onemocnění SLE, které bez adekvátní léčby mohou vést k renálnímu selhání a jsou spojeny se zvýšenou morbiditou a mortalitou. Při stanovení této diagnózy se zahajuje tzv. indukční léčba, která má za úkol navodit remisi onemocnění, na níž navazuje udržovací léčba s cílem remisi udržet. Výběr terapie se liší i podle toho, zda se jedná o první léčbu při primomanifestaci LN či o léčbu opakovaných relapsů. Jednotlivé studie je často obtížné mezi sebou srovnávat, i proto, že se liší definice relapsů, remisí, cílů a délky studií.

Zlatým standardem léčby proliferativních forem lupusové nefritidy stále zůstávají nespecifická imunosupresiva a cytotoxické preparáty v čele s cyklofosfamidem (CFA), a nověji mykofenolát mofetilem (MMF) a event. cyklosporinem A (CyA).

1.3.1. Cyklofosfamid (CFA)

CFA je alkylační látka, jež se biotransformací cytochromem P 450 mění v aktivní metabolit 4-hydroxycyklofosfamid a dále neenzymaticky na horčičný fosforamid a akrolein [148]. Fosforamid je vlastní aktivní látka, která pravděpodobně působí na jadernou DNA krevních buněk (alkylace guanidinových reziduí) [149], zatímco akrolein působí toxicky na močový měchýř. Vedle poškození B- a T-lymfocytů moduluje cyklofosfamid aktivační odpovědi T-buněk a tvorbu protilátek B-buňkami.

Metaanalýza 25 randomizovaných studií z posledních 20 let 20. století zahrnovala 915 pacientů [150], většina studií srovnávala terapii CFA a azathioprinem v kombinaci se steroidy a podání samotných kortikoidů. Kombinovaná imunosupresivní terapie CFA redukovala riziko zdvojnásobení kreatininu oproti samostatné terapii kortikoidy. Vzhledem k tomu, že dlouhodobá kontinuální terapie CFA byla spojena s četnými nežádoucími účinky zapříčiněnými jeho toxicitou (postihující zejména močový měchýř, kostní dřeň a gonády) byla snaha o stanovení optimální účinné dávky minimalizující tato rizika. V současnosti jsou používány režimy intermitentního podávání. Nejvýhodnější pro evropskou populaci se zdá být dávkování dle protokolu studie Euro-Lupus [151], kam bylo zařazeno 90 pacientů a srovnáno podání nižších (6 pulsů CFA á 500mg) a vyšších dávek cyklofosfamidu (8 pulsů CFA á 1g), obě terapie následovány udržovací terapií azathioprinem. Po 73 měsíců trvajícím sledování nebyla ve skupině s nižšími dávkami CFA větší pravděpodobnost zdvojnásobení sérového kreatininu či terminálního renálního selhání než ve druhé skupině [152].

1.3.2. Cyklosporin A

CyA je cyklický polypeptid patřící mezi kalcineurinové inhibitory. Po průniku do buňky se váže na cytoplazmatický receptor (cyklofilin), následně dochází k blokadě komplexu kalcineurin/kalmodulin a je inhibována aktivace transkripčního faktoru NF-ATc (jaderný faktor aktivovaných lymfocytů) a dochází k poklesu syntézy IL-2, IL3 a IFN γ , což inhibuje aktivaci T lymfocytů [153].

Nežádoucí účinky zahrnují hlavně nefrotoxicitu a vznik hypertenze. Podkladem pro vznik nefrotoxických projevů je pravděpodobně vazokonstrikce cév glomerulů, která vyvolává snížení průtoku krve ledvinami. Důsledkem je pak zvýšení hladiny sérového kreatininu v plazmě a vznik hypertenze. Hepatotoxicita se projeví cholestázou, hyperbilirubinémií a zvýšením aminotransferáz. Zvýšená produkce fibroblastů a kolagenu vyvolává projevy hirzutismu a gingivální hyperplazie. Při větších dávkách se objevují též projevy neurotoxické ve formě křečí, psychických poruch. Mezi predisponující faktory neurotoxického působení patří zejména snížení hladiny magnezia a cholesterolu.

Terapie CyA je jednou z alternativ terapie LN, není však mnoho randomizovaných studií, které by porovnávaly v indukční fázi účinnost tohoto preparátu s dalšími léky.

Více dat je u studií s pacienty s membranózní LN (třída V), kde byla prokázána účinnost CyA v navození remise [154, 155].

1.3.3 Mykofenolát Mofetil (MMF)

MMF je po vstřebání hydrolyzován na kyselinu mykofenolovou, selektivní nekompetitivní inhibitor inositol-5-monofosfátdehydrogenázy, mající jednu z hlavních úloh při syntéze guanidinu. MMF inhibuje proliferaci T a B lymfocytů, MMF také potlačuje glykosylaci adhezivních molekul a tím inhibuje chemotaktické procesy [153].

Asijská studie [156] zahrnující 41 pacientů, srovnávala účinnost a bezpečnost léčby kortikoidů s MMF po dobu 12 měsíců s kontinuálním CFA (2,5mg/den) po dobu 6 měsíců následovanou terapií AZA. Tato studie prokázala, že je terapie MMF stejně účinná a méně toxická než terapie CFA. V dalším sledování (63 měsíců) Chan a kol. [157] rozšířil skupinu pacientů, na konci sledování měli pacienti z obou větví studie srovnatelné výsledky, co se týče četnosti relapsů, navíc terapie MMF byla spojena s menší mortalitou.

V roce 2005 Američané [158] publikovali data z dvouleté randomizované studie se 140 pacienty srovnávající terapii MMF (až 3g/den) s pulsním CFA (0,5-1 g/m²), kde byl MMF dokonce více efektivní a bezpečnější než terapie CFA.

Ve stejném roce Contreras a kolegové [159] ukázali na randomizované studii s 59 pacienty, kteří dostali jako indukční terapii pulzní CFA (0.5 to 1.0 g/m²) a následně byli randomizováni do 3 větví udržovací terapie: pulsy CFA (čtvrtletně), AZA (1-3 mg/kg/den) nebo MMF (0,5 -3 g/den), že MMF a AZA v udržovací fázi byly účinnější a bezpečnější než terapie CFA.

Nedávno byla publikována data z mezinárodní randomizované studie ALMS [160] srovnávající dvouletou indukční terapii MMF (3g/den) a pulsním CFA (0,5 -1,0 g/ m²). Studie potvrdila, že MMF je stejně účinný jako CFA v navození remise. Zajímavé byly odlišnosti v jednotlivých etnických a rasových skupinách, lépe na MMF odpověděli pacienti s černou rasou, hispánci a latinsko-americká rasa. V druhé části této studie [161] trvajících 36 měsíců byli pacienti randomizováni do dvou větví udržovací terapie MMF (2g/den) vs. AZA (2mg/kg/den). Terapie MMF byla v této fázi účinnější než AZA v udržení remise a předcházení relapsu a to bez ohledu na typ indukční terapie.

Problémem nadále zůstává vysoká cena léčby MMF, proto není možné ji používat ve větší míře a je vyhrazena u pacientů s intolerancí CFA či u mladých žen, plánujících graviditu a pacientů černé rasy.

2. Hypotézy a cíle práce

2.1. Hypotézy

1. Hladiny anti m-CRP protilátek korelují s aktivitou onemocnění SLE a jsou zvýšené u pacientů s aktivní LN.
2. Hladiny anti-mCRP protilátek nekorelují se sérovými hladinami proteinů akutní fáze a s hladinami protilátek typickými pro LN.
3. Pozitivita anti-mCRP protilátek predikuje horší odpověď na terapii.

V druhé části práce jsme srovnávali účinnost dlouhodobé léčby cyklosporinem A s pulsním cyklofosfamidem u nemocných s proliferativními formami LN v rámci randomizované studie.

4. Indukční terapie cyklosporinem A je stejně účinná jako terapie cyklofosfamidem v navození remise LN a je méně toxická.
5. Po 9-ti a 18-ti měsíční terapii dochází k úpravě hladiny komplementu C3 a poklesu hladin protilátek (anti-dsDNA, anti-C1q a antinukleosomů).

2.2. Cíle

Cílem první části práce bylo:

1. Provést korelaci anti-mCRP protilátek s aktivitou onemocnění, definovanou indexem aktivity onemocnění SLE (SLEDAI) a porovnání hladin anti-mCRP u pacientů s aktivní a neaktivní LN.
2. Provést korelaci hladin anti-mCRP protilátek s mCRP, sérovým amyloidem A (SAA), hladinami anti-dsDNA a anti-C1q.
3. Ve dvouletém sledování porovnat odpověď (parciální a kompletní remise vs. relaps či non-response) u pacientů se vstupní pozitivitou a negativitou anti-mCRP.

4. Porovnání odpovědi (navození remise onemocnění) u skupiny léčené cyklosporinem A a cyklofosfamidem po 9 a 18 měsících a 7 letech terapie. Porovnat nežádoucí účinky terapie ve skupině léčené cyklosporinem A a cyklofosfamidem.

5. Porovnání přítomnosti C3, anti dsDNA, hladin anti-C1q a antinukleosomů u pacientů před terapií a po terapii ve skupině léčené cyklofosfamidem a cyklosporinem A.

3. Anti-mCRP protilátky u pacientů s lupusovou nefritidou-1.část práce

3.1. Pacienti a metody

3.1.1. Pacienti

Do studie bylo zařazeno 57 pacientů (47 žen, 10 mužů) ve věku od 18 do 65 let (medián 32), splňujících kriteria pro SLE dle American College of Rheumatology (ACR) [162]. Všichni pacienti měli LN prokázanou renální biopsií v letech 1996-2010 na Klinice Nefrologie VFN a 1. LFUK. Výsledky renální biopsie byly dodatečně patologem překlasifikovány dle recentního ISN/RPS hodnocení [25]. Charakteristika pacientů je uvedena v tabulce č. 3.

V letech 2005-2010 bylo od těchto pacientů odebráno celkem 119 vzorků séra (vzorky byly odebírány v různých fázích onemocnění, počet vzorků na pacienta byl v rozmezí 1-7). Jako kontrolní materiál sloužily vzorky séra, odebrané 122 zdravým dobrovolníkům, věkově korespondujícím se souborem pacientů.

Parametr	Pacienti (n=57)
Věk (medián, roky)	32
Pohlaví M/Ž	10/47
Rasa	
Kavkazská	55
Asijská	2
Aktivita LN	46
Renální biopsie	
Třída II	2
Třída III	13
Třída IV	28
Třída III/V or IV/V	11
Neurčená třída	3

Tab.3: Základní charakteristika pacientů, čísla jsou absolutní počty pacientů, pokud není určeno jinak.

LN, lupusová nefritida.

Pro účely porovnání sérových hladin anti-mCRP s kontrolním souborem a pro sledování závislosti těchto hladin na aktivitě onemocnění a dalších parametrech jsme od každého pacienta náhodně vybrali jeden vzorek séra, který byl analyzován.

Do druhé části projektu, zaměřené na význam anti-mCRP v predikci odpovědi na terapii, byli zahrnuti pacienti (n=29) s nově diagnostikovanou aktivní LN, od kterých byl k dispozici vzorek séra z doby renální biopsie. Sledování byli po dobu 3,6 až 8,1 let (medián 5,9) na Klinice Nefrologie VFN a 1. LFUK a v Revmatologickém Ústavu v Praze. Po roce od renální biopsie jsme měli výsledky od 26 pacientů, dva pacienti byli ztraceni ze sledování a jeden pacient zemřel. Ve druhém roce byla z analýz vyřazena pacientka, která nesplňovala kritéria ani pro odpověď ani pro relaps, došlo u ní ke zhoršení renální funkce, nebyla však provedena rebiopsie k ozřejnění důvodu progresu (vliv terapie vs. chronické poškození vs. aktivita).

Výsledky na konci sledování, k březnu 2014 (t.j. medián 5,9 let) máme k dispozici u 25 pacientů, z nichž 2 pacientky jsme z analýzy vypustili, vzhledem k non-compliance s terapií, a tedy i nemožností posoudit, zda aktivita onemocnění nebyla spojena s neužíváním doporučené léčby. Dvě pacientky byly v průběhu sledování rebiopsivány pro výrazné zhoršení renální funkce s výsledkem LN třída VI, obě progredovaly do terminálního renálního selhání (ESRD) s následnou náhradou funkce ledvin.

Přehled indukční a udržovací terapie je uveden v tabulce č. 4. Současně všichni obdrželi kortikosteroidy.

V době odběru vzorku již část pacientů měla nasazenou kombinovanou imunosupresivní terapii (5 pacientů CFA, 4 pacienti AZA, který užívali dlouhodobě z důvodu extrarenální aktivity SLE, 15 pacientů mělo pouze kortikosteroidy), 5 pacientů bylo zcela bez terapie.

	Anti-mCRP negativní (n=16)	Anti-mCRP pozitivní (n=13)
Indukční terapie		
CFA	9	8
MMF či MFA	2	3
CyA	1	2
AZA	1	2
CFA+plazmaferéza	0	1
Udržovací terapie		
AZA	9	5
MMF či MFA	4	2
CyA	2	4

Tab. 4: Přehled indukční a udržovací terapie v jednotlivých skupinách. Vyjádřeno v absolutních počtech pacientů.

AZA, azathioprin; CFA, cyklofosfamid; CyA, cyklosporin A; MFA, mykofenolová kyselina; MMF, mykofenolát mofetil.

V průběhu dalšího sledování, kdy byl monitorován průběh renálních relapsů, bylo jako terapie použito ve 2 případech MMF, další pacient s velmi rezistentním průběhem onemocnění obdržel 2 cykly pulsů CFA, následně pak ještě CyA p.o., jeden pacient obdržel CyA bez efektu s následnou konverzí na terapii MMF. Dva pacienti obdrželi zvýšené dávky kortikoidů. Jedna pacientka i přes podání pulzů CFA, dále pak CyA i MMF progredovala do ESRD aniž by kdy odpověděla na léčbu.

Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se studií zaměřenou na stanovování anti-C1q protilátek. Dodatečně bylo lokální etickou komisí schváleno dostanovení dalších parametrů potřebných v naší studii. Do doby analýzy byla séra pacientů skladována v -80° C.

3.1.2. Definice

Aktivita celkového onemocnění byla hodnocena indexem aktivity SLEDAI [163]. Za aktivní renální onemocnění jsme považovali to, kde byla splněna alespoň 2 kritéria z následujících: aktivní močový sediment a/nebo proteinurie $\geq 0,5$ g/den a/nebo zhoršení glomerulární filtrace o $\geq 25\%$ (oproti vstupním hodnotám) a/nebo C3 hypokomplementemie.

Po jednom a dvou letech terapie byla hodnocena odpověď podle Evropského konsenzu [164]. Parciální odpověď byla hodnocena jako negativní močový sediment, proteinurie $\leq 0,5\text{g/den}$, normální nebo stabilní renální funkce ($<10\%$ deteriorace oproti vstupním hodnotám).

Kompletní odpověď byla hodnocena jako negativní močový sediment, proteinurie $\leq 0,2\text{g/den}$, stabilní renální funkce ($< 10 \%$ deteriorace oproti normálním hodnotám, pokud byly vstupně abnormální).

Relaps byl hodnocen jako zvýšení aktivity vyžadující intenzivnější terapii, avšak až po dosažení minimálně parciální remise.

Za dobrý výstup jsme považovali dosažení alespoň parciální remise, naopak non-response či renální reaktivace-relaps byly považovány za negativní výstup.

V prodlouženém sledování byl hodnocen počet renálních relapsů, jako negativní výstup byl hodnocen alespoň jeden relaps.

3.1.3. Stanovení anti-mCRP protilátek

Hladiny anti-mCRP byly stanoveny pomocí *in house* ELISA dle Sjowalla a kol. [147] s drobnými modifikacemi. Sto nanogramů lidského nativního CRP (Sigma, USA) bylo rozpuštěno ve 100 μl uhličitanového pufru (50 mM, pH 9,6), nanášeno na mikrotitrační destičky (Maxisorp, Nunc, Dánsko) a inkubováno přes noc při pokojové teplotě. Po promytí fosfátovým puftrem (PBS) s přidavkem 0,05% Tweenu 20 bylo do destičky napipetováno 100 μl séra (ředěného 1: 20 PBS Tweenem) a inkubováno při pokojové teplotě po dobu 60 minut. Po opětovném promytí PBS-Tweenem, bylo přidáno 100 μl králíčích IgG protilátek proti lidským γ -řetězcům, konjugovaných s alkalickou fosfatázou (DAKO, Dánsko) - (ředěno 1:500 v PBS-Tween). Po hodině inkubace a promytí PBS Tweenem bylo přidáno 100 μl *p*-nitrofenyl fosfátu (Sigma, USA) rozpuštěného v reakčním pufru (uhličitanový pufr, 50 mM, pH 9,6; 1 mM MgCl_2) do finální koncentrace 10 mg/ml. Po hodině inkubace (pokojová teplota, temno) byla reakce ukončena přidáním 25 μl 3 M NaOH. Absorbance byly odečteny při 405 nm. Všechny vzorky byly analyzovány v kvadruplikátech. Kalibrační křivka byla zkonstruována sériovým ředěním nejpozitivnějšího vzorku vzorkem negativním. Výsledky jsou uvedeny v jednotkách (AU), které jsou vyjádřeny % nejvyššího vzorku. Detekční limit byl 15.

3.1.4. Stanovení dalších parametrů

Na stanovení byly použity komerčně dostupné ELISA kity pro SAA (Invitrogen, USA) a antiC1q (Buhlmann Laboratories, Švýcarsko). Vše výše uvedené, včetně anti-mCRP, bylo měřeno v ÚLBLD VFN a 1.LFUK.

High sensitivity CRP (Siemens, USA) bylo měřeno nefelometricky na přístroji BN II (Siemens, USA) v ÚHKT.

V době odběru vzorku, během rutinního skríníngu byly stanoveny další imunologické parametry - složky komplementu- C3 a C4 (nefelometricky, Siemens, USA), anti-dsDNA (IF a/nebo ELISA, Orgentec, Německo), anti-dsDNA bylo hodnoceno semikvantitativně z důvodu sjednocení více metod), antinukleosomy (ELISA, BL Diagnostika, Německo). Stejně tak i základní biochemické parametry, včetně stanovení clearance endogenního kreatininu a kvantitativní proteinurie, vše měřeno v ÚLBLD VFN.

3.1.5. Statistické zpracování

Vzhledem k negaussovskému rozložení byla data analyzována pomocí neparametrických testů. Výsledky jsou uváděny jako medián a 5. – 95. percentil. Mann-Whitney rank sum test, Kruskal-Wallisova ANOVA a Spearmanův korelační koeficient byly počítány pomocí programu STATISTICA (verze 10). Chí kvadrát, Fisher exact test a logistická regrese byla počítána pomocí programu EpiInfo (verze 3.5.3). Vzorkům s koncentrací protilátek anti-mCRP nižší než byl limit detekce (15 AU), byla pro účely výpočtů přiřazena hodnota 7,5 AU.

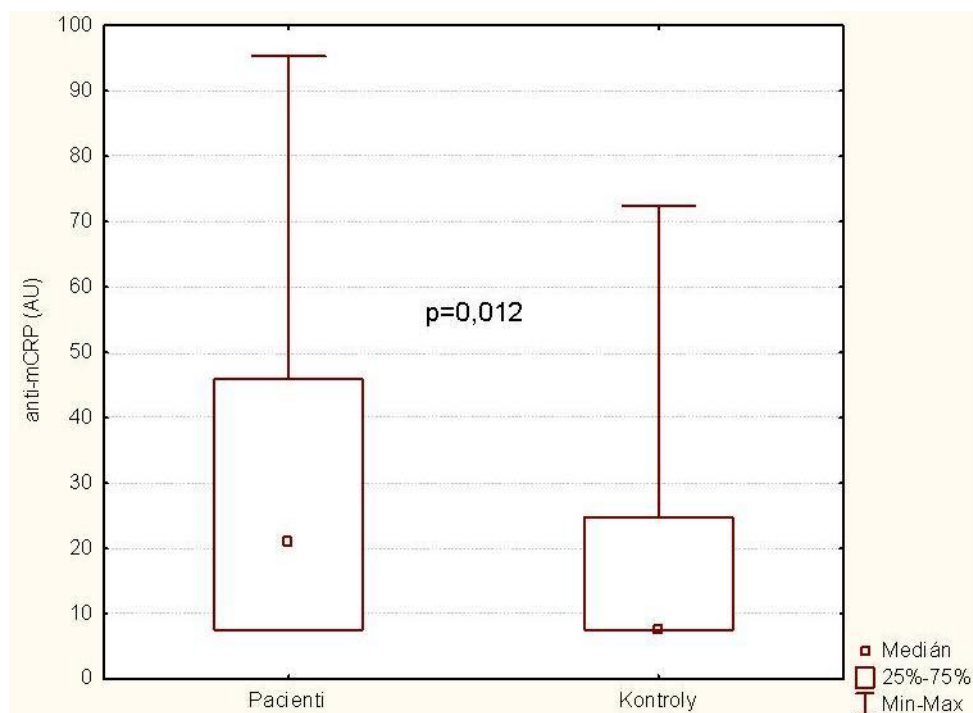
3.2. Výsledky

3.2.1 Anti-mCRP jako marker aktivity LN a SLE, 1.část

3.2.1.1. Koncentrace anti-mCRP u zdravé populace

Vzhledem k tomu, že anti-mCRP nepatří k běžně vyšetřovaným analytům, není k dispozici ani referenční materiál ani informace o tom, jaké hladiny lze považovat za normální. Pro účely naší studie jsme tudíž stanovili vlastní referenční hodnoty na základě souboru 122 zdravých dobrovolníků. Celkem 68 (56 %) z nich mělo hladiny anti-mCRP pod detekčním limitem metody (<15 AU), maximální hodnota byla 72,4 AU. Za horní hranici normy považujeme hodnotu rovnou 95. percentilu tohoto kontrolního souboru, tj 45,45 AU.

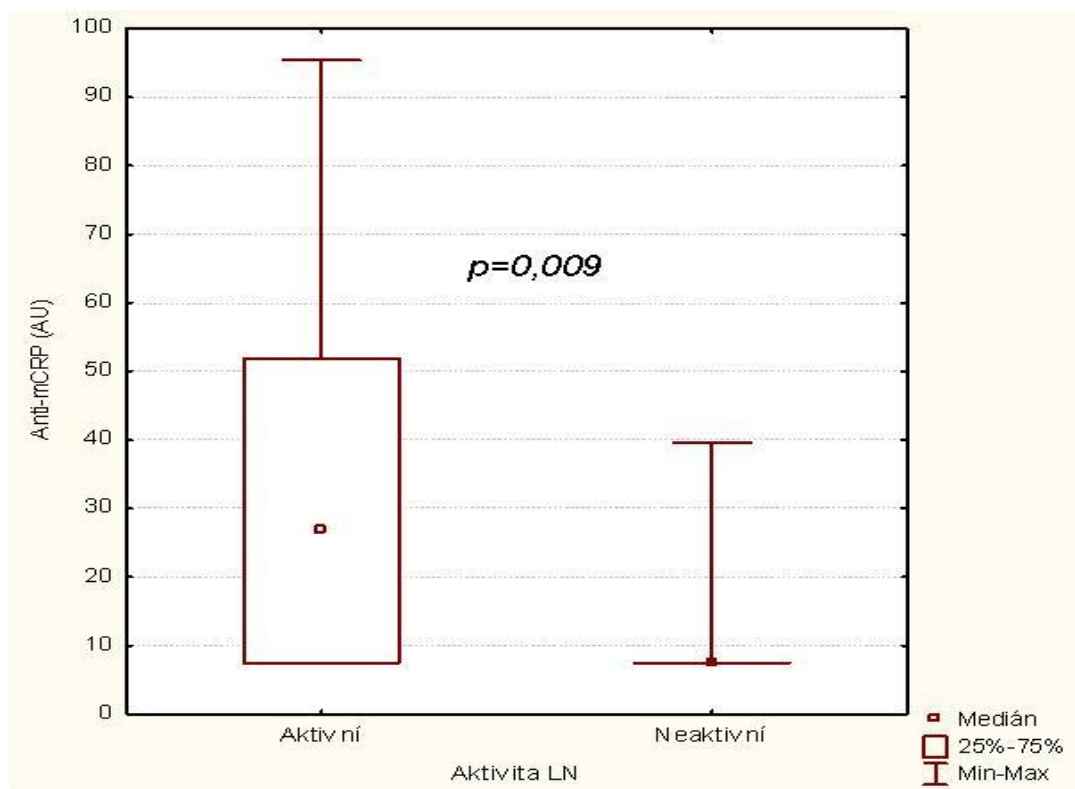
Porovnávali jsme hladiny anti-mCRP pacientů a zdravých kontrol, v souladu s očekáváním byly významně vyšší hladiny protilátek u pacientů než u kontrol (21,1 AU (7,5-98,6) vs 7,5 AU (7,5-45,5); $p=0,012$). Grafické znázornění je v obrázku č. 7.



Obr. 7: Porovnání hladin anti-mCRP pacienti vs kontroly.

3.2.1.2. Hladiny anti-mCRP u pacientů s aktivitou onemocnění

Ve studii byli pacienti nacházející v různém stadiu onemocnění, někteří měli aktivitu renálního onemocnění, jiní byli v remisi. Hladiny anti-mCRP byly významně vyšší u pacientů s aktivitou LN (26,78 vs 7,5; $p=0,009$). Viz obrázek č. 8.



Obr. 8: Srovnání hladin anti-mCRP a přítomnosti aktivity LN.

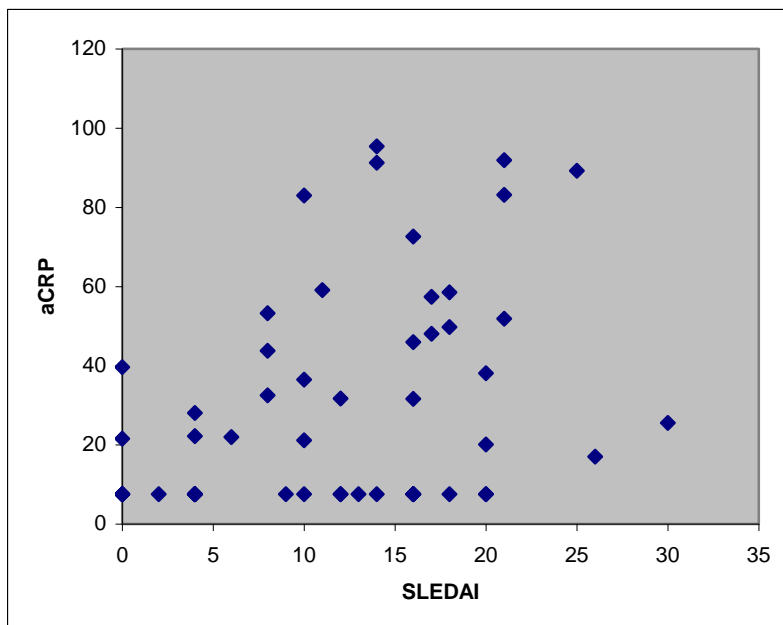
Positivní anti-mCRP měla třetina pacientů s aktivitou LN, ve skupině pacientů s neaktivní LN se nikdo s pozitivními anti-mCRP nenašel (Tabulka č. 5). Tento rozdíl je na samé hranici statistické významnosti ($p=0,051$).

	Aktivní LN	Neaktivní LN
Anti-mCRP pozitivita	15	0
Anti-mCRP negativita	31	11

Tab. 5: Srovnání positivity/negativity anti-mCRP protilátek a aktivity LN ($p=0,051$; Fisher exact test). Vyjádřeno v absolutních počtech pacientů.

LN, lupusová nefritida.

U tohoto souboru jsme zjistili významnou korelaci mezi hladinami anti-mCRP a celkovou aktivitou SLE, charakterizovanou indexem SLEDAI ($r_s = 0,406$, $p = 0,002$), graficky je znázorněna na obrázku č. 9.



Obr.9: Korelace mezi hladinami anti-mCRP a aktivitou onemocnění SLE.

3.2.1.3. Vztah mezi hladinami anti-mCRP a proteiny akutní fáze

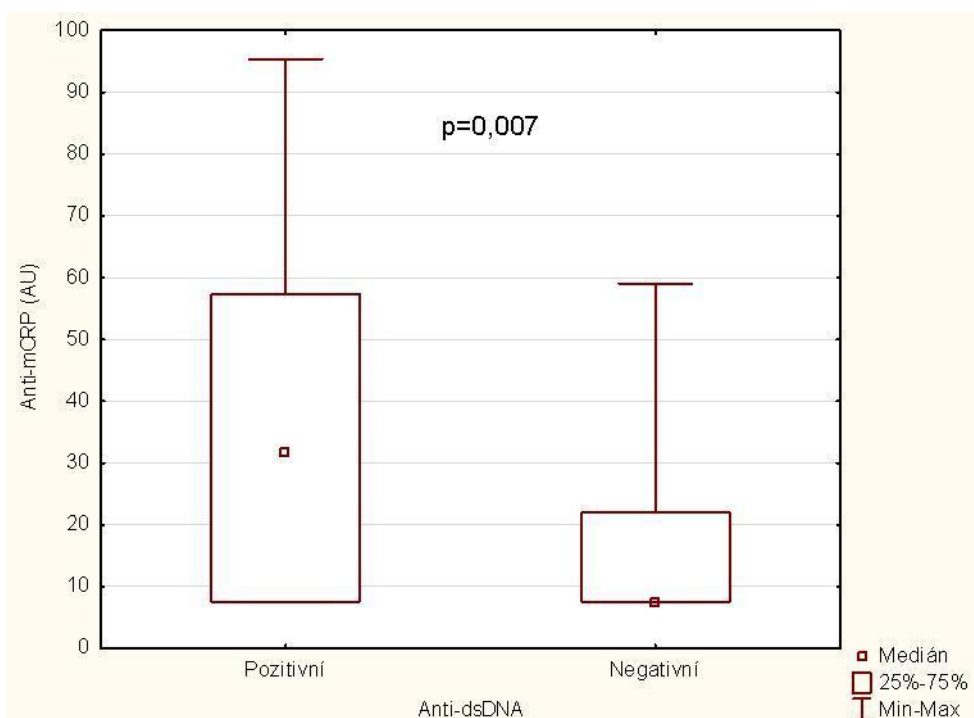
Vzhledem k tomu, že se jedná o vyšetření protilátek proti mCRP, nás zajímalo, jaký je vztah k vybraným proteinům akutní fáze. Anti-mCRP nekorelovaly s SAA ani s hsCRP.

3.2.1.4 Vztah mezi anti-mCRP a jinými protilátkami typickými pro SLE a LN a komplementem

Zkoumali jsme souvislost mezi anti-mCRP a dalšími imunologickými parametry typickými pro aktivitu LN. Anti-mCRP nekorelovaly s hladinami anti-C1q ($r_s = 0,127$; $p < 0,353$).

Statisticky významná byla korelace mezi poklesem složky komplementu C3 a vzestupem anti-mCRP ($r_s = -0,509$, $p < 0,0001$), stejně tak i poklesem C4 a vzestupem anti-mCRP ($r_s = -0,528$, $p < 0,0001$).

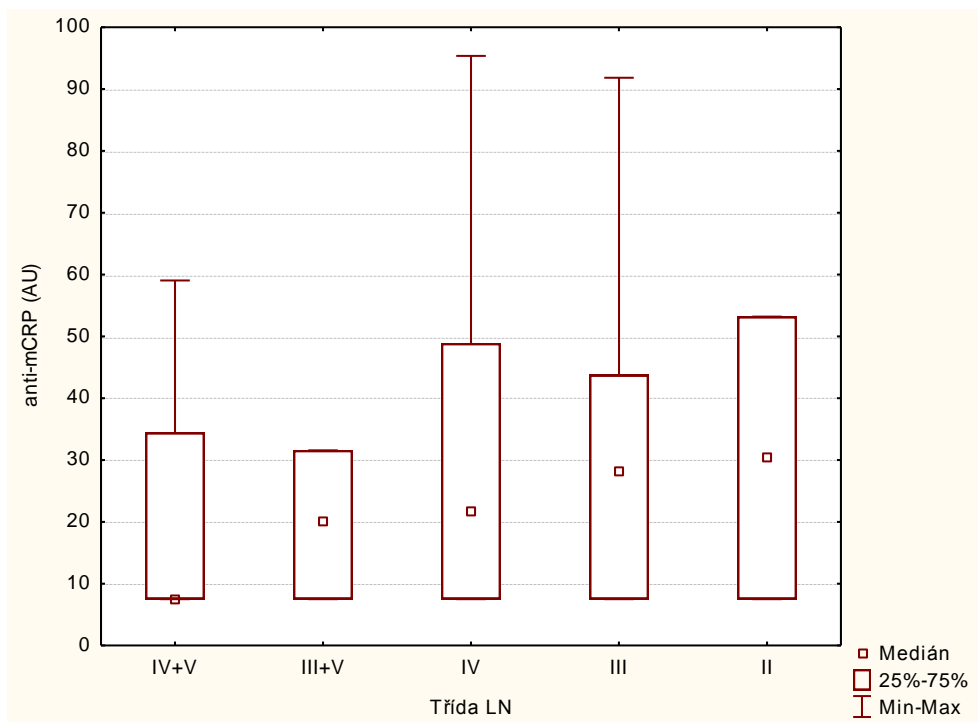
Dále jsme srovnávali hladiny anti-mCRP u pacientů anti-dsDNA pozitivních a negativních. Pacienti s pozitivitou anti-dsDNA měli hladiny anti-mCRP signifikantně vyšší 31,6 AU (7,5-91,6) vs 7,5 AU (7,5-57,8); $p = 0,007$. Viz obrázek č. 10.



Obr. 10: Porovnání hladin anti-mCRP u pacientů s anti dsDNA pozitivitou a negativitou.

3.2.1.5. Hladiny anti-mCRP u jednotlivých forem LN

Jedním z našich předpokladů bylo, že by pacienti s proliferativními třídami LN měli mít vyšší hladiny anti-mCRP. Výsledně rozdíl mezi jednotlivými skupinami nebyl statisticky významný ($p=0,85$). Viz obrázek č. 11.



obr.11: Srovnání hladin anti-mCRP u různých tříd LN, (Kruskal-Wallisova ANOVA, $p=0,85$). LN, lupusová nefritida.

Porovnali jsme i proliferativní formy LN (tj. třída III, IV, kombinované formy III+V a IV+V) s neproliferativními (třída II), kterou tvořili pouze 2 pacienti, a ani zde jsme neprokázali rozdíl ($p=0,945$).

3.2.2. Anti-mCRP jako prediktor odpovědi na léčbu v dlouhodobém sledování, 2. část

Na skupině pacientů ($n=29$), sledovaných po dostatečně dlouhou dobu jsme chtěli ověřit předpoklad, zda by vstupní koncentrace anti-mCRP (a případně jiných parametrů) mohly sloužit jako prediktor odpovědi na léčbu.

3.2.2.1. Porovnání vstupních parametrů jednotlivých skupin

Vzhledem k výsadnímu postavení anti-mCRP v této práci nás zajímalo, jestli se anti-mCRP+/- pacienti liší ve vstupních parametrech. Signifikantní rozdíl byl pouze mezi hladinami složky komplementu C4, přehled vstupních parametrů je znázorněn v tabulce č. 6.

Parametr	Anti-mCRP pozitivní (n=13)	Anti-mCRP negativní (n=16)	p
věk (medián)	27,2 (20,4-54,8)	32,5 (21,8-60,9)	NS
pohlaví (M/Ž)	2/11	1/15	NS*
Sérový kreatinin (μmol/l)	71 (47,2-147)	84 (51,75-255,5)	NS
Clearance kreatininu (ml/s)	1,48 (0,64-2,81)	1,4 (0,2-3,06)	NS
Proteinurie (g/den)	1,04 (0,26-6,36)	0,83 (0,24-5,65)	NS
Erythrocyturie	84,6%	81,3%	NS*
C3 (g/l)	0,49 (0,21-0,84)	0,55 (0,35-1,12)	NS
C4 (g/l)	0,06 (0,06-0,11)	0,08 (0,06-0,24)	0,029
antiC1q (U/ml)	235,98 (8,04-500)	154,3 (35,95-500)	NS
hsCRP (mg/l)	4,7 (0,38-11,02)	3,4 (0,38-22,55)	NS
SAA (ug/ml)	140,9 (8,0-190,6)	134,9 (9,4-225,1)	NS
SLEDAI	17 (9,2-22,6)	17,5 (4,0-29,25)	NS
Renální biopsie**			
Třída II	1	0	NS
Třída III	4	5	
Třída IV	8	6	
Třída III/V nebo IV/V	0	5	

Tab.6: Srovnání vstupních laboratorních a klinických dat pacientů.

Data jsou uvedena jako medián (5. a 95. percentil)

Erythrocyturie-v procentech pacientů s pozitivní erythrocyturií

Mann-Whitney U test

* Fisher exact test

** absolutní počty pacientů

HsCRP, high sensitivity CRP; SAA, sérový amyloid A, SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Activity Index.

Hlavním cílem bylo otestovat, zda některý z vyšetřovaných parametrů může sloužit jako prediktor odpovědi v různých časových intervalech. Největší důraz jsme kladli na anti-mCRP, nicméně testovali jsme i možnou roli dalších možných faktorů, které by mohly odpověď na léčbu ovlivňovat.

3.2.2.2. Výsledky po roce terapie

Po roce terapie (na konci indukční fáze) 5 pacientů se vstupní anti-mCRP pozitivitou alespoň parciálně odpovědělo na léčbu, 6 pacientů zůstalo bez odpovědi. Ze skupiny anti-mCRP negativních mělo příznivou odpověď 9 pacientů a 5 pacientů na terapii neodpovědělo. Přehled výstupů terapie je uveden v tabulce č.7.

Status	12 měsíců		24 měsíců	
	Vstupní anti-mCRP pozitivita (n=12)	Vstupní anti-mCRP negativita (n=16)	Vstupní anti-mCRP pozitivita (n=11)	Vstupní anti-mCRP negativita (n=15)
Kompletní odpověď	5	3	4	9
Parciální odpověď	0	6	1	4
Non response	6	5	5	1
Relaps*			1	0

Tab.7: Terapeutické výstupy.

Vyjádřeno v absolutních počtech pacientů.

*Relaps mohl být hodnocen pouze při splnění alespoň parciální remise v prvním roce terapie.

Po roce terapie nebyla anti-mCRP pozitivita vyšším rizikem pro horší odpověď na léčbu, OR (95% CI)=1,8 (0,29-11,44); p=0,268. Ani žádný z dalších testovaných parametrů nebyl rizikovým, zkoumané parametry jsme uvedli v tabulce č.8.

Nepříznivý výstup po 1 roce terapie				
	p	OR	95% CI	
Anti-mCRP pozitivita	0,368	1,76	0,29	11,44
Sérový kreatinin >90 µmol/l	0,563	1,24	0,17	9,10
Proteinurie ≥1g/den	0,324	0,51	0,07	3,14
Hematurie	0,422	0,51	0,04	5,51
Nízké C3	0,245	3,80	0,30	216,31
Anti- dsDNA pozitivita	0,578	1,35	0,13	19,31
SLEDAI >12	0,422	0,51	0,04	5,51
Věk nad 25 let	0,422	0,51	0,04	5,51

Tab. 8: Predikce terapeutického výstupu po roce terapie.

CI, konfidenční interval; OR, odds ratio; SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Activity Index.

3.2.2.3. Výsledky po dvou letech terapie

Po dvou letech terapie 5 pacientů, se vstupní anti-mCRP pozitivitou, odpovědělo na terapii (či odpověď udrželo), 6 pacientů mělo nepříznivou odpověď (buď na terapii neodpověděli vůbec, či po dosažení odpovědi zrelabovali). Narozdíl od skupiny anti-mCRP negativních, kde na konci druhého roku většina pacientů (13/14) dosáhla přinejmenším parciální odpovědi a pouze jeden pacient na léčbu neodpověděl, žádný neměl po dosažení odpovědi relaps.

Opět jsme zkoušeli různé prediktory terapeutického výstupu, uvedeny jsou v tabulce č. 9.

Nepříznivý výstup po 2 letech terapie				
	p	OR	95% CI	
NR po roce terapie	0,027	10,797	0,977	596,618
Anti-mCRP pozitivita	0,014	13,742	1,222	770,869
Sérový kreatinin >90 µmol/l	0,246	0,275	0,005	3,107
Proteinurie ≥1g/den	0,649	0,940	0,105	7,500
Hematurie	0,564	1,681	0,126	98,296
Nízké C3	0,146	-	0,392	-
Anti- dsDNA pozitivita	0,436	0,515	0,044	7,845
SLEDAI >12	0,564	1,681	0,126	98,296
Věk nad 25let	0,436	0,515	0,044	7,845

Tab.9: Predikce terapeutického výstupu po 2 letech terapie.

CI, konfidenční interval; NR, non-response, t.j. nepřítomnost odpovědi; OR, odds ratio; SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Activity Index.

Z univariátních analýz vyšly dva nadějně prediktory a to vstupní anti-CRP pozitivita a špatná odpověď na léčbu po roce sledování.

Identifikované prediktory jsme podrobili detailnější analýze-vzhledem k tomu, že spolu vzájemně nekorelují ($r_s=0,144$, $p=0,482$), lze je považovat za nezávislé rizikové faktory. Jejich vzájemnou kombinací bychom mohli odpověď v druhém roce terapie předpovědět spolehlivěji, než při použití prediktorů zvlášť. Velikost souboru pacientů je však poměrně malá, a tak neumožňuje korektní provedení vícenásobné regrese. Z univariátních analýz (viz výše) vyplývá, že riziko nesené oběma faktory je zhruba stejné (OR 10,8 vs 13,7), a tak si můžeme dovolit oba faktory pro účely výpočtů sloučit do jednoho prediktoru. Tento sloučený rizikový faktor (SRF) může nabývat hodnot 0 (pacient nemá ani vstupní anti-mCRP pozitivitu, ani nepříznivou odpověď v prvním roce), 1 (pacient má jen jeden z rizikových faktorů) a 2 (pacient nese oba rizikové faktory). Takto upravená data jsme analyzovali logistickou regresí: výstupem byla odpověď ve druhém roce, jakožto prediktor sloužil SRF. Z analýzy vyplývá, že přítomnost jediného z výše uvedených rizikových faktorů výrazně zvyšuje riziko nepříznivé odpovědi, OR (95%CI)=26,3 (2,2-308.7), $p=0,0094$. V případě, že pacient ponese oba rizikové faktory, bude (ve srovnání s pacientem bez rizikového faktoru) čelit více než padesátinásobnému riziku negativní odpovědi v druhém roce.

3.2.2.4. Výstupy v dlouhodobém sledování

Pacienti byli sledováni do března 2014, celková doba sledování byla 5,9 let (3,6-8,1 let). Sledovali jsme kolik pacientů mělo v mezidobí rekativaci renálního onemocnění (relaps).

Čtyři z deseti vstupně anti-mCRP pozitivních pacientů mělo alespoň jeden relaps, jedna pacientka neodpověděla na terapii a následně progredovala do ESRD.

Ve skupině vstupně anti-mCRP negativních měli 2 pacienti z 9 relaps, jeden z nich dále progredoval do ESRD.

Opět jsme zkoušeli různé parametry, které by mohly předvídat horší vývoj onemocnění. Nenašli jsme žádný rizikový faktor mezi zkoušenými parametry, i když anti-mCRP se pohybuje v blízkosti hranic statistické významnosti. Zkoumané prediktory jsou uvedeny v tabulce č. 10.

Nepříznivý výstup na konci sledování				
	p	OR	95% CI	
NR po roce terapie	0,556	0,76	0,08	6,23
NR či relaps po 2 letech terapie	0,267	2,84	0,27	31,72
Anti-mCRP pozitivita	0,092	5,07	0,58	71,07
Sérový kreatinin >90 µmol/l	0,190	0,23	0,00	2,62
Proteinurie ≥1g/den	0,582	1,24	0,13	10,51
Hematurie	0,508	1,95	0,14	114,67
Nízké C3	0,523	0,64	0,05	9,88
Pozitivita anti- dsDNA	0,351	0,38	0,02	6,48
SLEDAI>12	0,508	1,95	0,14	114,67
Věk nad 25let	0,352	0,38	0,02	6,48

Tab.10: Predikce terapeutického výstupu na konci sledování.

CI, konfidenční interval; NR, non-response, t.j. nepřítomnost odpovědi; OR, odds ratio; SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Activity Index.

3.2.2.5. Doba dosažení odpovědi na terapii

Zajímalo nás, zda mají anti-mCRP vliv na dobu dosažení remise, předpokládali bychom prodlouženou dobu aktivity onemocnění. Mezi skupinami (anti-mCRP pozitivními vs negativními) nebyl rozdíl, co se týče doby dosažení alespoň parciální odpovědi: (medián (25%-75%) 10,5 (2,95-21,35) vs 14 (5-36) měsíců, p=0,12.

3.3. Diskuze k první části práce

Výskyt anti-mCRP protilátek byl popsán již několika skupinami autorů, nejčastěji u pacientů s diagnostikovaným SLE [117, 142, 165]. Byly ale nalezeny například u primární biliární cirhózy [117] a nejnověji i u chronické virové hepatitidy C [166].

Prevalence anti-mCRP se u pacientů se SLE se v různých studiích liší, popsána byla v rozmezí od 23 % do 78 % [117, 136, 142, 143, 147]. Záleží na spektru pacientů, obecně bývá prevalence vyšší u pacientů s aktivnějším a zejména renálním postižením. U celého souboru našich pacientů s LN (s aktivním onemocněním i remisí) byla prevalence 26,3 % (tj. při dolní hranici výše uvedeného rozpětí). U pacientů s aktivní nefritidou však byla prevalence výrazně vyšší - 44,8 %, což je zcela v souladu s publikovanými výsledky Sjowalla a kol. [135]. Značně široké rozmezí publikovaných prevalencí anti-mCRP může být rovněž způsobeno tím, že toto vyšetření není zatím rutinně používáno a k dispozici není žádný referenční materiál. Referenční meze, které si stanovují jednotlivá pracoviště sama, se tedy mohou výrazně lišit. My jsme za horní hranici referenčního rozmezí považovali 95. percentil v kontrolním souboru 122 zdravých dobrovolníků. Obdobný postup zvolila i další pracoviště [135, 143].

Renální aktivitu SLE lze v současné době stanovit několika způsoby. Jako nejpřesnější se jeví mikroskopické vyšetření vzorku ledviny s posouzením aktivity a chronicity, kde je dobře patrný vývoj změn po terapii. Toto invazivní vyšetření však s sebou nese značná rizika pro pacienta. Rutinně vyšetřované sérové ukazatele mohou být při posuzování aktivity LN přínosné, sledovány jsou zejména protilátky anti-dsDNA, složky komplementu C3 a C4 a nověji i anti-C1q protilátky. Ani tyto ukazatele nelze považovat za zcela postačující, a tak se nemalé úsilí věnuje hledání dalších markerů, které by pomohly monitorovat aktivitu onemocnění a předvídat jeho další průběh. Jedním z nových nadějných ukazatelů by mohly být právě anti-mCRP protilátky. Jedním z cílů naší studie proto bylo posoudit vztah anti-mCRP protilátek a aktivity LN (případně vztah anti-mCRP a ostatních markerů aktivity LN). Již několik desetiletí se k diagnostice a sledování aktivity SLE využívají anti-dsDNA protilátky, které běžně nacházíme v séru i v glomerulech pacientů s LN [167], a jejichž sérové hladiny korelují s aktivitou onemocnění [168, 169]. V naší studii nás zajímal vztah těchto osvědčených markerů onemocnění a anti-mCRP. V souladu s pozorováním ostatních autorů [142] jsme našli zvýšené hladiny anti-mCRP u pacientů s pozitivitou anti-dsDNA.

Dalším častým nálezem u pacientů s aktivitou SLE a LN je hypokomplementemie [99]. V souladu s publikovanými pracemi jsme i v našem souboru prokázali mírnou (avšak statisticky velmi významnou) inverzní korelaci anti-mCRP s hladinami C3 i C4 složky komplementu ($r_s = -0,501$ a $r_s = -0,528$, $p < 0,0001$) [142]. Určitou, na komplementu nezávislou, roli anti-mCRP protilátek v patogenezi LN může naznačovat fakt, že nebyla prokázána korelace mezi anti-mCRP protilátkami a anti-C1q. I toto pozorování je ve shodě s jinými autory [135].

Dále se nám podařilo potvrdit dřívější pozorování jiných autorů [135], že hladiny anti-mCRP jsou významně (více než třikrát) zvýšené u pacientů s aktivitou LN. U žádného pacienta bez renální aktivity nemoci nebyly tyto protilátky zachyceny. Na základě předchozích výsledků se zdá, že anti-mCRP by mohly sloužit jako užitečný marker aktivity. Tyto protilátky pravděpodobně brání vazbě mCRP na C1q a faktor H a tímto mechanismem redukuje clearance (zprostředkovanou mCRP) buněk pozdní fáze apoptózy [134].

Pro možné využití anti-mCRP jakožto markeru aktivity onemocnění (alespoň u té části nemocných u které byly zjištěny) svědčí i pozorování Sjowalla a kol. [135], kteří pozorovali pokles těchto protilátek u pacientů při přechodu do remise onemocnění.

Domnívali jsme se, že by pacienti s proliferativními typy LN mohli mít vyšší hladiny anti-mCRP. Tyto třídy LN jsou spojeny s větším poškozením glomerulů a horší prognózou pokud nejsou adekvátně léčeny [22, 170]. Při porovnání jednotlivých typů LN jsme nenašli statisticky významné rozdíly. Z toho však nelze tvořit definitivní závěry, neboť ve skupině pacientů s neproliferativní LN bylo velmi málo jedinců. To bylo velmi pravděpodobně způsobeno tím, že pacienti s neproliferativními formami, z důvodu minimálních laboratorních nálezů, nebývají tak často bioptováni, a tedy i odhaleni.

Hladiny CRP v plazmě jsou u pacientů se SLE i přes aktivitu onemocnění nízké [138]. Důvod těchto snížených hladin je stále neobjasněný, zdá se však, že protilátky anti-mCRP na toto nemají vliv [136, 165]. V souladu s očekáváním jsme v naší studii nenalezli žádný vztah mezi CRP a hladinami anti-mCRP. Otázka sníženého CRP tak zůstává stále otevřena. Jedním z nově diskutovaných mechanismů je potlačení tvorby CRP (řízené IL-6) v hepatocytech, za kterým stojí IFN α [171]. Jiným důvodem může být zrychlená konverze CRP na mCRP [172]. MCRP se váže na laminin a fibronektin, extracelulární proteiny glomerulární matrix, zde se na něj můžou navázat anti-mCRP [173]. V *in vitro* studiích bylo ukázáno, že CRP a anti-mCRP protilátky na buněčném povrchu indukují při expozici makrofágům prozánětlivou odpověď [174]. Je pravděpodobné, že se zde jedná o mCRP, který je vázaný především ve tkáních [141]. Anti-mCRP tedy mohou interferovat s fyziologickou funkcí mCRP

v opsonizaci a odstraňování imunokomplexů a jaderných fragmentů, redukovat clearance buněk pozdní fáze apoptózy a tím se podílet na patogenezi LN [134, 135]. Navázané anti-mCRP mohou aktivovat komplement a tím může docházet k dalšímu poškození tkání [175]. Kromě renální aktivity nás zajímalo, zda by anti-mCRP mohly souviset s celkovou aktivitou onemocnění. V naší studii jsme potvrdili, že anti-mCRP korelovaly s aktivitou celkového onemocnění SLE [135, 136, 142].

Kromě markerů aktivity onemocnění se dlouhodobě hledají možné prediktory odpovědi na standardní terapii. Předvídáním reakce daného pacienta na léčbu lze terapeutický přístup modifikovat a zvýšit tak šanci na úspěšnou léčbu s minimalizací vedlejších účinků neúčinné terapie. Protilátky anti-mCRP by tento prediktivní potenciál mít mohly, alespoň to naznačují výsledky Sjowalla a kol., kteří popsali více než dvojnásobné riziko nepříznivé terapeutické odpovědi (potvrzené i opakovanou renální biopsií) u pacientů se vstupní anti-mCRP pozitivitou [135, 176]. Navíc pozorovali u jednotlivých pacientů pokles hladin anti-mCRP v závislosti na snížení aktivity onemocnění. Jejich soubor čítal 38 pacientů s aktivní LN, sledovaných po dobu průměrně 8 měsíců. Tyto výsledky jsou velmi slibné, doba pozorování je však poměrně krátká. Hlavním cílem naší studie tudíž bylo ověřit, zda vstupní pozitivita anti-mCRP může predikovat odpověď na standardní léčbu a zda jsme predikce schopni i v delším časovém horizontu. U našich pacientů s nově diagnostikovanou LN jsme proto v závislosti na vstupních hladinách anti-mCRP hodnotili terapeutický výstup po roce a dvou letech sledování a poté četnost relapsů v dalším sledování (median 5,9 let). Kromě anti-mCRP jsme testovali i další možné laboratorní či klinické prediktory odpovědi.

Kupodivu nebyl po roce sledování rozdíl v odpovědi na terapii mezi vstupně anti-mCRP pozitivními a negativními pacienty patrný (OR=1,76; p=0,368). To není zcela v souladu s výsledky Sjowalla a kol, které byly získány na patientském souboru s velmi podobnou klinickou charakteristikou [135]. Tato neshoda může být dána menší velikostí našeho souboru (25 vs 38), mírně delší dobou sledování (1 rok vs 8 měsíců), jinou „cut-off“ hodnotou pro posuzování anti-mCRP positivity či použitím jiných kritérií pro hodnocení odpovědi na terapii [164]. Narozdíl od zmíněné práce švédských autorů jsme neprováděli kontrolní rebiopsii, jejíž provedení považujeme, z důvodu již dříve zmiňovaných rizik pro pacienta, za neoprávněné.

V další fázi našeho sledování, po dvou letech terapie (t.j. až v průběhu udržovací léčby), jsme identifikovali dva významné nezávislé prediktory. Pacienti, kteří v prvním roce na terapii neodpověděli, mají ve druhém roce zhruba desetkrát vyšší riziko nepříznivého terapeutického

efektu. Podobné riziko neúspěchu terapie s sebou nese i vstupní pozitivita anti-mCRP protilátek. Je-li pacient nositelem obou rizikových faktorů, musíme u něj počítat s padesátinásobným rizikem selhání terapie v druhém roce. Takto silná predikce nás vede ke spekulaci, že u pacientů s vstupní anti-mCRP pozitivitou, kteří zároveň adekvátně neodpoví na terapii v průběhu indukční terapie do jednoho roku, by mělo být zváženo zintenzivnění stávající terapie či nasazení alternativní, např. biologické terapie.

Oproti silné predikci ve druhém roce, v prodlouženém sledování po dobu přibližně 6 let se anti-mCRP protilátky nezdály být statisticky významným prediktorem pro větší množství relapsů (OR=5; p=0,092). Jedním z možných důvodů mohla být i intenzivnější léčba pacientů se špatnou odpovědí na indukční léčbu a tím i suprese protilátek, které se prokazatelně snižují po úspěšné terapii s navozením odpovědi [135], příliš dlouhá doba mezi stanovením hladiny anti-mCRP a vyhodnocením odpovědi, nehomogenita patientského souboru (doba sledování se pohybuje v rozmezí 3,6-8,1 roku), případně i nedostatečná velikost patientského souboru. Můžeme předpokládat, že vyšetření hladin anti-mCRP protilátek v pozdější době (např. po dvou letech od zahájení terapie) by mohlo tuto predikci výrazně zlepšit. Jedná se však o spekulaci, pro kterou nemáme dostatečné důkazy.

Dle našich znalostí nikdo neprováděl studii s dlouhodobým sledováním vlivu těchto protilátek na vývoj onemocnění, proto jsou naše data v tomto smyslu unikátní. Velmi překvapivé je identifikace nebývale silných prediktorů ve druhém roce terapie.

Limitací naší studie byl menší soubor pacientů, nicméně vzhledem k vzácnosti tohoto onemocnění je velmi nesnadné soubor výrazně rozšířit. Dále pak absence rebiopsie, avšak pro rizika spojená s výkonem je téměř vyloučené toto vyšetření provádět bez dostatečného klinického důvodu. Výhodnější by bylo i analyzovat vzorky séra i v průběhu sledování, ta jsme však měli k dispozici jen u malé části pacientů. Vzhledem k velmi nadějným výsledkům této pilotní studie by v budoucnu bylo vhodné provést rozsáhlejší (multicentrickou) prospektivní studii, která by s definitivní platností potvrdila/vyvrátila užitečnost anti-mCRP protilátek v predikci odpovědi na terapii. Na jejím základě by bylo možno modifikovat doporučené postupy pro terapii SLE.

Výhodou bylo, že byli pacienti bioptováni a vyšetřeni na jednom pracovišti, následně pak sledování pouze na dvou pracovištích s podobným terapeutickým postupem, možností detailního zkoumání průběhu onemocnění, a proto tedy dobře srovnatelní.

3.4. Závěr:

V naší práci jsme našli vyšší hladiny anti-mCRP protilátky u pacientů s aktivitou LN (26,78 vs 7,5; $p=0,009$). Zároveň korelovaly i s aktivitou celkového onemocnění SLE, charakterizovaného SLEDAI ($r_s = 0,406$, $p=0,002$).

Anti-mCRP byly vyšší u pacientů s anti-dsDNA pozitivitou 31,6 AU (7,5-91,6) vs 7,5 AU (7,5-57,8); $p=0,007$. Inverzně korelovaly se složkami komplementu C3 ($r_s = -0,509$, $p < 0,0001$), stejně tak i C4 ($r_s = -0,528$, $p < 0,0001$). Nenašli jsme souvislost s proteiny akutní fáze.

Zásadním nálezem bylo zjištění, že pozitivita těchto protilátek vstupně předznamenává horší odpověď na léčbu po dvou letech standardní terapie, OR (95% CI)=13,7 (1,22-770,87); $p=0,014$. Dalším rizikovým faktorem byla horší odpověď na terapii v prvním roce. Při vyšetření logistickou regresí přítomnost jediného z výše uvedených rizikových faktorů výrazně zvyšuje riziko nepříznivé odpovědi, OR (95%CI)=26,3 (2,2-308,7), $p=0,0094$. V případě, že pacient ponese oba rizikové faktory, bude (ve srovnání s pacientem bez rizikového faktoru) čelit více než padesátinásobnému riziku negativní odpovědi v druhém roce.

4. Účinnost dlouhodobé léčby cyklosporinem A a pulsním cyklofosfamidem u nemocných s proliferativními formami lupusové nefritidy. Vliv terapie na hladiny protilátek antiC1q a antinukleosomů-2.část práce

4.1. Pacienti a metody

CYCLOFA LUNE je multicentrická otevřená randomizovaná kontrolovaná studie srovnávající účinnost a snášenlivost léčby cyklosporinem A a pulsním cyklofosfamidem u pacientů s proliferativními formami LN (třída III a IV).

Od ledna 2002 do prosince 2006, bylo v sedmi klinických centrech v České Republice a na Slovensku, zařazeno 40 pacientů se SLE, splňující kritéria ACR [162] a nově diagnostikovanou proliferativní LN (biopsicky prokázanou) dle WHO [24] či ISN/RPS [25]. Zároveň pacienti v době zařazení splňovali laboratorní aktivitu onemocnění, jež byla definována jako alespoň 2 kritéria z následujících: proteinurie >0,5g/den, mikroskopická hematurie nebo C3 hypokomplementemie. Věková hranice pro zařazení byla 18-50 let.

Před zařazením do studie pacienti podepsali informovaný souhlas. Studie byla schválena lokálními etickými komisemi.

4.1.1. Vylučovací kritéria

Zařazení nemohli být pacienti s předchozím užíváním CFA či CyA, nesměli být léčeni ani jinou imunosupresivní terapií či vyšší dávkou kortikosteroidů v předchozích 3 měsících. Dalším z vylučovacích kritérií byla perzistentní elevace sérového kreatininu >140 $\mu\text{mol/l}$, nekontrolovaná hypertenze (TK >180/100) refrakterní na terapii, těhotenství či kojení, cytopenie nemající vztah k základnímu onemocnění, dále koincidující závažná infekce, maligní onemocnění, závažné jaterní onemocnění a vředová choroba gastroduodena.

4.1.2. Studijní protokol

Randomizace do příslušných větví studie probíhala pomocí speciálního počítačového programu, prováděném centrálně v nepřetržitém 24 hodinovém provozu. Randomizace byla provedena do 48 hodin od provedení renální biopsie.

Doba studijní léčby trvala 18 měsíců, z toho 9 měsíců indukční terapie a 9 měsíců udržovací terapie.

větev 1 – CFA: pacienti obdrželi 8 pulzů i.v. (v dávce 10 mg/kg) v období 9 měsíců v prodlužujících se intervalech (2x po 3 týdnech, 4x po 4 týdnech, 2x po 6 týdnech), následovalo 4-5 p.o. pulzů (10mg/kg) v 6-8 týdenních intervalech.

větev 2- CyA: byl podáván kontinuálně p.o., v dávce 4-5 mg/kg/den po dobu 9 měsíců. Následně byla dávka snížena na 3,75-1,25 mg/kg/den po dobu dalších 9 měsíců.

Obě větve měly v kombinaci postupně se snižující udržovací dávku p.o. metylprednisolonu podávanou po dobu 18 měsíců. Vstupní dávka byla 0,8 mg/kg/den, během 8 týdnů se snížila na 0,2 mg/den, od 3 měsíce byla dávka 12 mg/den, od 5 měsíce 8mg/den, od 16 měsíce 4 mg/den.

4.1.3. Cíle studie

Primárním cílem bylo navození remise onemocnění na konci indukční a udržovací fáze terapie.

Sekundárním cílem byla incidence nežádoucích účinků a další období bez exacerbací ledvinného onemocnění.

4.1.4. Definice

Kompletní remise- hladina sérového kreatininu v normálním rozmezí, se stabilními či zlepšenými hodnotami oproti vstupním a inaktivní močový sediment a normální hodnoty proteinurie (<0,3g/24h).

Odpověď na terapii- hladina sérového kreatininu v normálním rozmezí, se stabilními či zlepšenými hodnotami oproti vstupním a minimálně 50% redukce proteinurie, t.j. pod 3g/den, pokud byla vstupně nefrotická, nebo < 0,5g/den, pokud nebyla vstupně nefrotická a negativní močový sediment *nebo* minimálně 25% zvýšení C3 hladiny komplementu.

Selhání léčby- definováno jako zhoršení renální funkce (zvýšení sérového kreatininu o 50 $\mu\text{mol/l}$) *nebo* perzistující nefrotická proteinurie ($>3,5\text{g/den}$) *nebo* nový či perzistující nefritický syndrom, splňující nejméně 3 z následujících kritérií: 33% vzestup sérového kreatininu, aktivní močový sediment, proteinurie $>0,5\text{g/den}$ *nebo* C3 hypokomplementemie.

Relaps- byl hodnocen na konci udržovací fáze (t.j. 18 měsíců terapie), definován stejně jako selhání léčby s tím, že podmínkou bylo dosažení odpovědi na terapii na konci indukční fáze. V dlouhodobém sledování byl relaps definován jako nová renální aktivita onemocnění vyžadující agresivnější imunosupresivní terapii.

V dlouhodobém sledování (po ukončení studijního protokolu) bylo renální zhoršení hodnoceno dvojestupňově. Jako vzestup sérového kreatininu o 50% či více *nebo* více než 100% oproti nejnižší hodnotě naměřené během studijního protokolu. Pokud bylo zdvojení sérového kreatininu zachyceno na konci obou studijních fází a současně při obou kontrolách po studii byla tato změna hodnocena jako trvalá.

ESRD bylo definováno jako zhoršení renální funkce vyžadující náhradu funkce ledvin (dialýzu či transplantaci).

4.1.5. Klinické a laboratorní testy

Nemocní podstoupili v předem stanovených časových úsecích následující vyšetření: před zahájením léčby, po 1,5 měsíci, 3 měsících, 4,5 měsících, 6 měsících, 9 měsících, 12 měsících, 15 měsících a 18 měsících, t.j. v době ukončení studované léčby.

Vyšetřované imunologické testy zahrnovaly zjištění přítomnosti cirkulujících autoprotilátek a to antinukleárních (ANA)-IF, anti-dsDNA (ELISA, Orgentec, Německo) a hodnoty C3 a C4 komponent komplementu (nefelometricky, Siemens, USA) na našem pracovišti – *nebo* jinými standardními laboratorními metodami jednotlivých pracovišť.

V imunologické laboratoři FN Olomouc byly stanoveny anti-C1q ELISA metodou (Buhlmann Laboratories, Švýcarsko) a antinukleosomy (Organtec Diagnostica GmbH, Německo). Tato vyšetření byla provedena dodatečně ze vzorků mražených sér.

Aktivita choroby klasifikována vyšetřujícím lékařem podle systému SLEDAI [163].

4.1.6. Bezpečnostní kontroly

U skupiny léčené CyA, byly sledovány jako testy bezpečnosti kontrolovány hodnoty systémového krevního tlaku, sérového kreatininu a plazmatických metabolitů CyA za použití vysokotlaké chromatografie (HPLC) s hodnotami mezi 100-150 ng/ml.

U skupiny léčené CFA, byly prováděny kontroly krevního obrazu a jaterních testů vždy před a po intravenózním nebo perorálním podání.

Ženy ve fertilním věku byly během léčby zkoumanými preparáty chráněny hormonální antikoncepcí.

4.1.7. Prodloužené sledování

Po ukončení studijního protokolu byla provedena dvě vyhodnocení stavu pacientů, pomocí dotazníků zaslanych do jednotlivých klinických center, a to v dubnu 2009 a dubnu 2012. Analyzována byla data od pacientů, kteří byli sledováni více než 5 let od randomizace.

4.1.7.1. Provedená vyšetření v prodlouženém sledování

Zajímaly nás parametry renálních funkcí (hladiny sérového kreatininu, proteinurie, vyšetření močového sedimentu)

Součástí dotazníku bylo vyhodnocení vyšetření dlouhodobého poškození orgánů v závislosti na základním onemocnění pomocí Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology Damage Index (SLICC/ARI DI).

Dále jsem vyhodnocovali nežádoucí účinky terapie: ESRD, úmrtí, maligní onemocnění, závažná kardiovaskulární onemocnění, komorbidity, zajímalo nás množství následných těhotenství či sterilita. Rovněž byla zaznamenána další imunosupresivní terapie kterou pacienti obdrželi.

4.1.8. Statistické zpracování

K porovnání mezi skupinami byl použit nepárový t-test v jednotlivých skupinách bylo provedeno srovnání za pomoci párového t-testu. Kategorické proměnné byly srovnány χ^2 a Fisher exact testem. Křivky přežití byly konstruovány pomocí Kaplan-Meierovy metody a statisticky testovány log-rank testem. Pacienti vyřazení během protokolu studie byli zařazeni do analýzy přežívání a účinnosti léčby.

Porovnání protilátek u jednotlivých skupin pomocí Mann-Whitney rank sum testu.

V prodlouženém sledování byla normálně rozložená data porovnána párovým t-testem, na ostatní byl použit Wilcoxon rank sum test.

4.2. Výsledky

Ze 40 pacientů, splňujících vstupní a vylučovací kritéria, bylo 21 pacientů randomizováno do větve léčené CFA a 19 do větve léčené CyA. V tabulce č. 11, jsou uvedeny základní vstupní charakteristiky pacientů z obou větví terapie.

Parametr	CFA (n=21)	CyA (n=19)	p
Pohlaví - M/Ž	6/15	5/14	1,00
Třída LN - ¾	7/14	9/10	0,37
Věk (roky)	30 ± 9	28 ± 5	0,45
Sérový kreatinin (μmol/l)	83,8 ± 22,7	80,7 ± 22,5	0,66
Clearance kreatininu (ml/s/1.73m ²)	1,46 ± 0,47	1,36 ± 0,42	0,50
Proteinurie/24 hr (g/l)	3,8 ± 4,9	2,5 ± 2,4	0,29
Sérový albumin	29,6 ± 6,6	29,9 ± 9,9	0,89
C3 složka komplementu (g/l)	0,54 ± 0,27	0,58 ± 0,27	0,63
C4 složka komplementu (g/l)	0,08 ± 0,04	0,06 ± 0,03	0,17
Systolický krevní tlak (mmHg)	127,1 ± 17,3	128,5 ± 12,1	0,77
Diastolický krevní tlak (mmHg)	81,2 ± 10,7	80,8 ± 5,6	0,88
SLEDAI	19,9 ± 7,9	19,3 ± 4,5	0,76
Non-renální SLEDAI	10,2 ± 7,1	9,7 ± 3,7	0,79
Hematurie přítomna/nepřítomna	16/5	14/5	0,85
Anti-dsDNA pozitivní/negativní	15/6	18/1	0,09
Snížené C3/normální C3	16/5	16/3	0,41
Snížené C4/normální C4	16/5	16/3	0,41

Tab.11: Vstupní charakteristika pacientů, uvedeny jsou průměrné hodnoty±směrodatná odchylka, převzato ze [177].

LN, lupusová nefritida; SLEDAI, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index.

Během studie bylo ze studie vyřazeno 5 pacientů, z toho v průběhu prvních 9 měsíců terapie 2 pacienti. Jeden pacient byl z větve léčené CFA pro rychle se zhoršující renální insuficienci, progredující do ESRD. Druhý pacient byl z větve CyA, laboratorně došlo ke zhoršení proteinurie, močového sedimentu, bylo podezření na non-compliance s léčbou. Během udržovací fáze byli vyřazeni další 3 pacienti, všichni z větve CFA. Dva pacienti pro nefritický relaps s nutnou úpravou medikace, jeden pacient pro akutní projevy neurolupusu s nutnou intenzifikací terapie.

V první části dlouhodobého sledování (duben 2009) jsme obdrželi dotazník s informacemi o 38 pacientech, v další fázi (duben 2012) jsme získali detaily o průběhu onemocnění o 36

pacientech. Ze 4 ztracených pacientů jsme od 2 měli informace pokrývající dobu 5 let od randomizace, tedy jsme s nimi počítali i v dlouhodobém sledování.

Dávka CyA musela být redukována u 3 pacientů z důvodu přechodného zhoršení renálních funkcí. U dvou pacientů bylo nutno podat vyšší dávky metylprednisolonu i.v. pro extrarenální aktivitu. Dávka metylprednisolonu byla u ostatních pacientů v rozmezí povoleném protokolem.

4.2.1. Odpověď na terapii

Na konci indukční fáze na terapii odpovědělo 11 pacientů z CFA a 8 pacientů z CyA větve. Kompletní renální remise dosáhlo 5 pacientů v každé větvi. Na terapii neodpovědělo 7 pacientů z CFA a 3 pacienti z CyA větve, mezi skupinami nebyly statisticky významné rozdíly. Tři pacienti z CFA větve a 7 pacientů z CyA nesplnili kriteria pro dobrý ani špatný výstup.

Na konci udržovací fáze terapie odpovědělo na terapii 8 pacientů z CFA větve a 11 z CyA větve, kriteria pro remisi splňovali 3 pacienti z CFA a 7 pacientů z CyA větve. Léčba selhala u 7 pacientů z CFA a 3 pacientů z CyA větve. Sedm pacientů z CFA a 5 pacientů z CyA nesplnili kriteria pro odpověď ani selhání léčby. Přehled výstupů terapie je v tabulce č. 12.

Na konci indukční fáze bylo ve skupině léčené CFA významné zlepšení sérového kreatininu ($p=0,02$). Na konci udržovací terapie tento rozdíl již významný nebyl. Naopak ve větvi léčené CyA mělo více pacientů absenci proteinurie na konci studijního protokolu ($p=0,02$). Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 13.

Parametr	9 měsíců			18 měsíců		
	CFA (n=21)	CyA (n=19)	p	CFA (n=21)	CyA (n=19)	p
Remise	5	5	0,86	3	7	0,15
Odpověď (Response)	11	8	0,52	8	11	0,21
Splněné kritérium pro remisi či odpověď						
- stabilní/zlepšený sérový kreatinin	18	9	0,02	12	11	0,96
- 50% pokles proteinurie*	13	16	0,24	11	14	0,16
- proteinurie < 0,3g/den	8	13	0,06	8	14	0,02
- inaktivní močový sediment	12	15	0,19	14	15	0,49
- normální/zlepšená hladina C3	18	15	0,57	16	16	0,53
Selhání léčby	7	3	0,28	6	3	0,46
Splněné kritérium pro selhání léčby						
- sérový kreatinin (vzestup > 50 μmol/l)	1	0	1,00	2	1	1,00
- proteinurie > 3,5 g/24h	2	0	0,49	2	1	1,00
- perzistentní nefritická aktivita**	4	3	1,00	4	1	0,34

Tab.12: Terapeutické výstupy

Pacienti jež dosáhli remise, jsou zároveň zahrnuti v položce odpověď na terapii; 3 a 7 pacientů z CFA skupiny a 8 a 5 pacientů z CyA skupiny nesplnili v 9 a 18 měsících léčby kritéria ani pro odpověď, ani pro selhání léčby. Z těch co odpověděli na léčbu v 9 měsících, u větve CyA žádný neměl renální relaps v 18 měsících, 2 pacienti z větve CFA měli renální relaps.

* pokles na hodnoty pod 3g/den pokud vstupně nefrotická nebo ≤ 0.5 g/den pokud nebyla vstupně nefrotická

** definováno jako jakákoliv 3 kritéria z následujících: 33% vzestup sérového kreatininu, mikroskopická hematurie, proteinurie > 0.5g/den, nízká C3 složka komplementu

CFA, cyklofosfamid; CyA, cyklosporin A.

4.2.2. Dynamika laboratorních změn v průběhu terapie

4.2.2.1. Vývoj renálních parametrů

V průběhu prvních šesti týdnů proteinurie poklesla a hladina sérového albuminu vzestoupila v obou studijních větvích. Po 3 měsících se clearance kreatininu se zlepšila pouze ve větvi léčené CFA ($p=0,006$). Ve stejné době hladina sérového kreatininu vzestoupila ve skupině léčené CyA, po této době již byla zvýšena pouze nesignifikantně. Změny jsou zobrazeny graficky na obrázku č. 12.

Na konci indukční fáze byla průměrná hladina sérového kreatininu signifikantně snížena a glomerulární filtrace zvýšena ve větvi léčené CFA. Ve skupině léčené CyA byla snížena v tomto časovém horizontu snížena signifikantně proteinurie. Viz tabulka č. 13.

Parametr	vstupně	9 měsíců	18 měsíců	Follow-up
Sérový kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)				
- CFA skupina	83,8 \pm 22,7	75,5 \pm 13,9	84,0 \pm 21,57	78,0 \pm 18,4
- CyA skupina	80,7 \pm 22,5	88,2 \pm 20,1	86,7 \pm 24,0	70,9 \pm 8,8
- p	0,66	0,03	0,72	0,14
Glomerulární filtrace (ml/min/1.73m^2)*				
- CFA skupina	86,9 \pm 24,9	94,5 \pm 23,6	85,6 \pm 22,1	92,8 \pm 23,6
- CyA skupina	91,2 \pm 24,6	79,6 \pm 19,7	84,2 \pm 28,3	98,9 \pm 16,9
- p	0,59	0,04	0,88	0,38
Proteinurie/24 hr (g/l)				
- CFA skupina	3,8 \pm 4,9	1,03 \pm 1,24	1,41 \pm 2,8	1,73 \pm 4,8
- CyA skupina	2,5 \pm 2,4	0,20 \pm 0,19	0,41 \pm 0,89	1,15 \pm 3,73
- p	0,29	0,01	0,19	0,68
Hematurie (přítomna/nepřítomna)				
- CFA skupina	16/5 (76%)	9/11 (45%)	7/10 (41%)	5/14 (26%)
- CyA skupina	14/5 (74%)	4/14 (22%)	4/14 (22%)	4/14 (22%)
- p	0,85	0,18	0,29	0,77

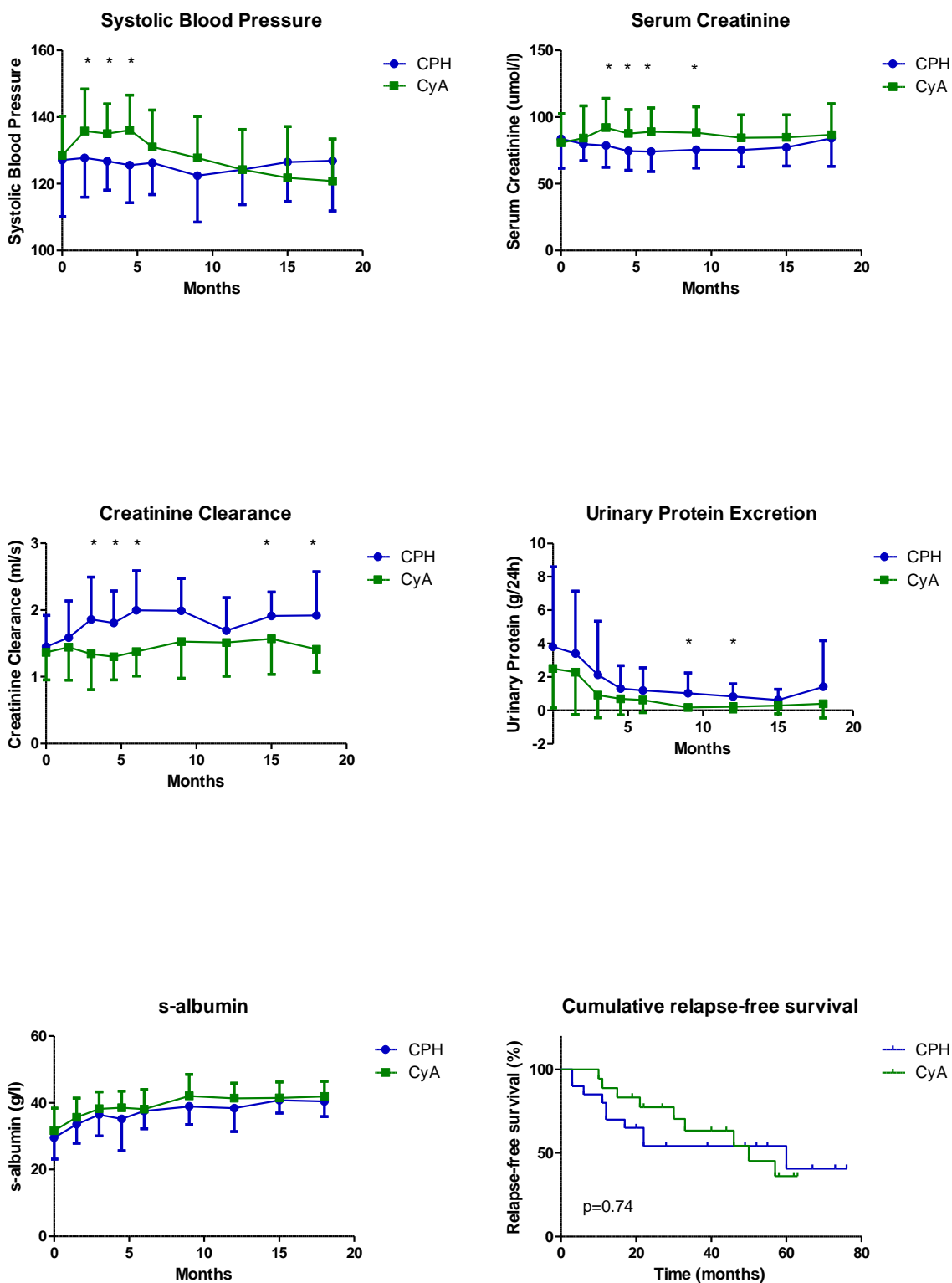
Tab.13:Laboratorní hodnoty pacientů, rozděleno do skupin dle obdržené terapie

*MDRD (Modification of Diet in Renal Disease).

CFA, cyklofosfamid; CyA, cyklosporin A.

Vývoj hladin sérového kreatininu, clearance kreatininu, sérového albuminu, proteinurie a porovnání jednotlivých skupin je graficky znázorněno na obrázku č. 12. Na konci indukční terapie, při porovnání obou skupin, nebyl rozdíl v hladinách složky komplementu C3. Stejně tak se nelišily obě skupiny v počtu pacientů s hladinami C3 v normálním referenčním rozmezí na konci obou fází sledování.

Nebyl rozdíl mezi skupinami co se týče počtu pacientů s anti-dsDNA negativitou na konci 9 a 18 měsíce sledování.



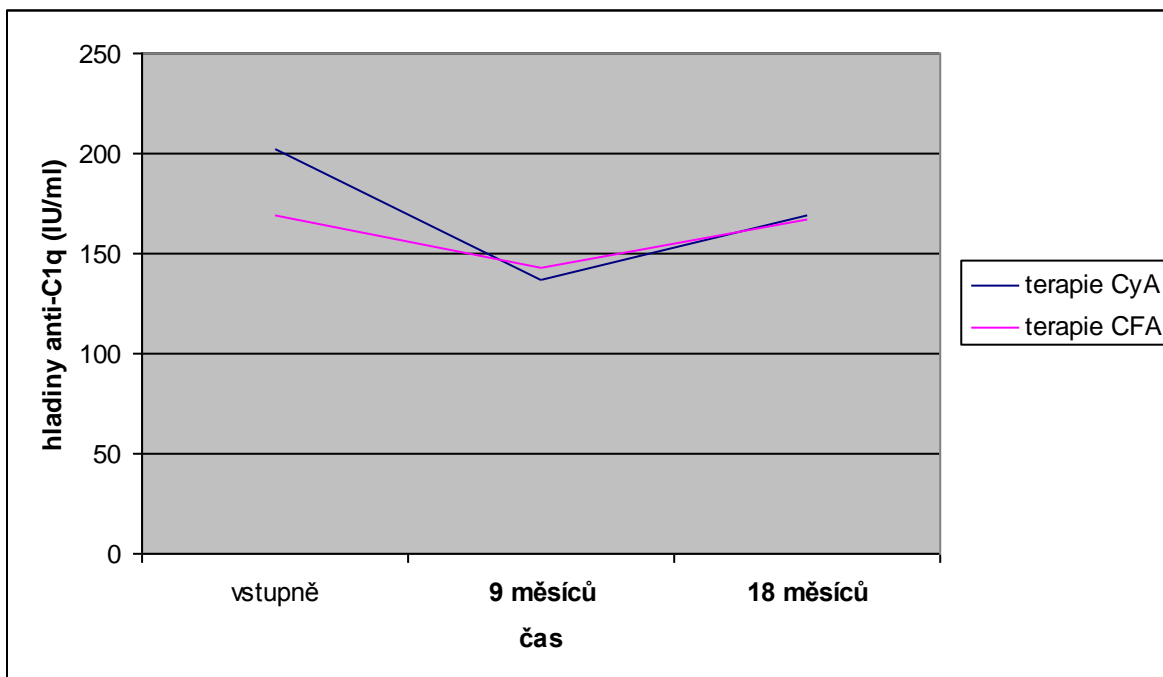
Obr.12: Srovnání vývoje hladin sérového kreatininu, clearance kreatininu, sérového albuminu, proteinurie a systolického krevního tlaku u jednotlivých léčebných skupin. Doba přežití bez relapsu.

*statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

CyA, cyklosporin A; CPH, cyklofosfamid.

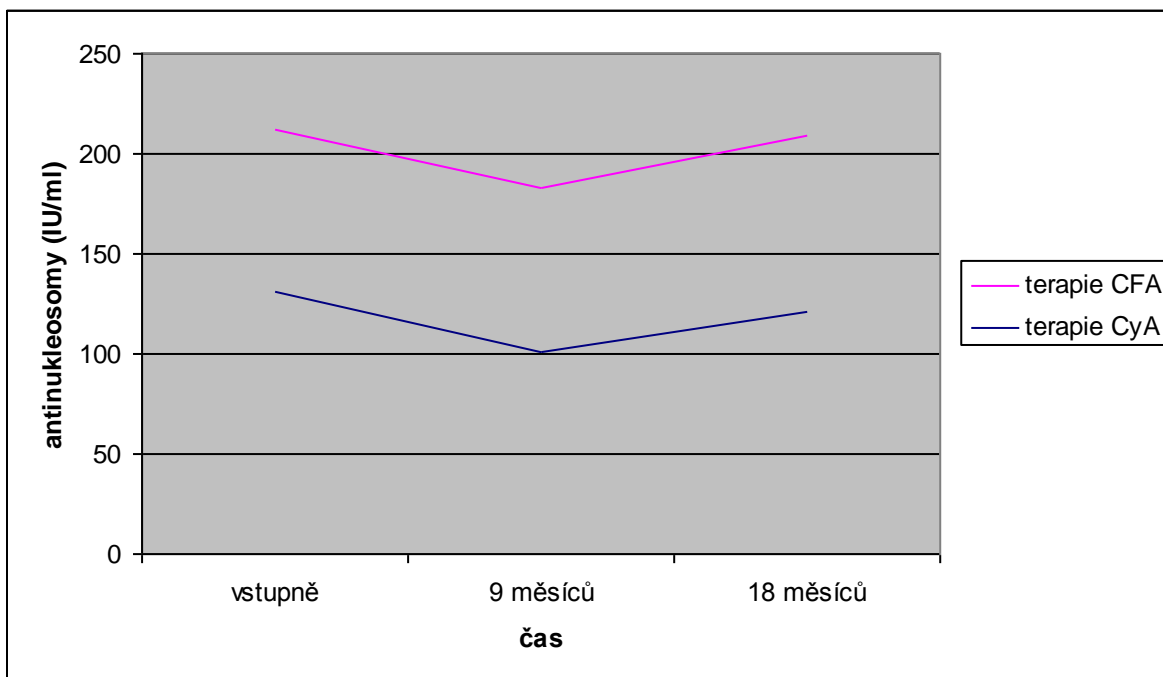
4.2.2.2 Vývoj hladin anti-c1q a antinukleosomů

Mezi oběma větvemi studie (CFA vs.CyA) nebyl statisticky významný rozdíl, co se týče vývoje hladin protilátek anti-C1q, vstupně 169,1 vs 201,9 IU/ml, po 9 měsících terapie 142,8 vs 136,8 IU/ml, po 18. měsících léčby 167 vs 169 IU/ml, grafické znázornění je na obrázku č. 13.



Obr. 13: Vývoj hladin anti-C1q v jednotlivých terapeutických větvích
CyA, cyklosporin A; CFA, cyklofosfamid.

Dále byly měřeny hodnoty antinukleosomů, vstupně 80,6 vs 131,1 IU/ml, po 9 měsících terapie 82,0 vs 100,7 IU/ml a po 18 měsících 88,6 vs 120,8 IU/ml, ani zde nebyl mezi skupinami významný rozdíl. Viz obrázek č. 14.



Obr. 14: Vývoj hladin antinukleosomů v jednotlivých terapeutických skupinách.

CFA, cyklofosfamid; CyA, cyklosporin A.

Byla nalezena korelace mezi hladinami anti C1q a antinukleosomy ($r_s = 0,68$; $p < 0,001$).

4.2.3. Nežádoucí účinky terapie

Jednou z našich hypotéz bylo, že terapie CyA bude méně toxická než CFA.

U 3 pacientů léčených CyA byla pozorována přechodná elevace sérového kreatininu, která se upravila po snížení dávky léku. Dále bylo pozorováno přechodné zvýšení systolického krevního tlaku ve skupině léčené CyA oproti CFA, jež je znázorněno na obrázku č. 12. Tento vzestup byl statisticky významný v době od 6 týdnů do 4,5 měsíců od začátku léčby, po půl roce léčby hodnoty krevního tlaku poklesly na vstupní hodnoty a nebyl rozdíl mezi oběmi sledovanými skupinami. Krevní tlak byl korigován antihypertenzní medikací u všech pacientů. V průběhu studie bylo množství antihypertenziv vyšší ve skupině léčené CyA (1,5 vs 0,7 antihypertenziv/osobu, $p=0,7$), jinak rozdíl nebyl ani před léčbou ani po léčbě. U jednoho pacienta z větve CyA byly pozorovány generalizované křeče (3 dny po zahájení léčby). U jiného pacienta z této skupiny byla pozorována tranzienční ischemická příhoda (3 měsíce od zahájení terapie). Oba pacienti zůstali bez následků. Tyto příhody nebyly považovány za spojené s terapií. Incidence infekčních komplikací a leukopenie byly srovnatelné v obou skupinách. Ve skupině léčené CFA byl popsán jeden případ perzistentní

amenorhey. Žádný pacient neměl hemoragickou cystitidu. Přehled nežádoucích účinků je obsažen v tabulce č. 14.

	CFA	CyA
Parametr	n (%)	n (%)
Úmrtí	0 (0%)	0 (0%)
Leukopenie	4 (20%)	2 (11%)
Alopecie	1 (5%)	0 (0%)
Hirsutismus	0 (0%)	1 (5%)
Zvýšený krevní tlak	6 (29%)	10 (53%)
Amenorhea	1 (5%)	0 (0%)
Přechodné zvýšení sérového kreatininu	0 (0%)	3 (16%)
Herpes zoster	2 (10%)	1 (5%)
Močová infekce	1 (5%)	1 (5%)
Sepse	1 (5%)	0 (0%)
Perianální absces	0 (0%)	1 (5%)
Tranzitorní ischemická ataka	0 (0%)	1 (5%)

Tab.14: Nežádoucí účinky, zahrnutí pacienti s minimálně jedním nežádoucím účinkem.

CFA, cyklofosfamid; CyA, cyklosporin A.

4.2.4. Prodloužené sledování

Průměrná doba sledování byla 7,7 let (rozmezí 5-10,3), sledované parametry se signifikantně nelišily mezi jednotlivými skupinami. Data z dlouhodobého sledování shrnuje tabulka č.15.

Parametr	všichni (n=38)	CFA (n=19)	CyA (n=19)
Věk (roky), průměr (směrodatná odchylka)	39 (10)	37 (5)	38 (8)
ženy, n	27 (71)	13 (68)	14 (74)
Follow-up (roky), median (rozmezí)	7.7 (5.0-10.3)	7.4 (5.0-9.7)	8.3 (5.3-10.3)
50% zvýšení koncentrace sérového kreatininu	5 (13)	3 (16)	2 (11)
Zdvojení sérového kreatininu	2 (5)	1 (5)	1 (5)
Setrvalé zdvojení sérového kreatininu	2 (5)	1 (5)	1 (5)
Terminální renální selhání	2 (5)	1 (5)	1 (5)
Současná hladina sérového kreatininu ($\mu\text{mol/l}$)	67 (19)	71 (23)	63 (15)
Současná hodnota proteinurie (g/24h)	0.4 (0.6)	0.5 (0.5)	0.4 (0.7)

Tab. 15: Renální výstup ve dlouhodobém sledování, Převzato z [178].

Vyjádřeno v absolutních počtech pacientů (%), pokud není uvedeno jinak. Pacienti, jež splnili kritéria pro terminální renální selhání jsou započítáni i v položkách s mírnějším renálním postižením. Průměrný věk v dlouhodobém sledování je vypočten k době jejich poslední návštěvy (38 pacientů). Medián sledování je vypočten ke dni poslední návštěvy (38 pacientů).

CFA, cyklofosfamid; CyA, cyklosporin A.

V každé skupině byl jeden pacient s ESRD, oba podstoupili úspěšnou transplantaci ledviny. Jak je patrné v tabulce č. 16, oba pacienti s ESRD nedokončili protokol studie. První z nich (z větve CFA) byl vyřazen ze studie v 6 týdnu terapie pro rychlou progresi renální insuficience. Druhý pacient z CyA větve byl vyloučen ze studie po 6 měsících pro zhoršení močových nálezů a zejména pro suspekci na non-compliance s léčbou.

	Pacienti dokončivší protokol studie			Pacienti nedokončivší protokol studie		
	CFA (n=17)	CyA (n=18)	Celkem (n=35)	CFA (n=4)	CyA (n=1)	Celkem (n=5)
Pacienti s dostupnými daty	15	18	33	4	1	5
50% zvýšení koncentrace sérového kreatininu	1	1	2	2	1	3
Zdvojení sérového kreatininu	0	0	0	1	1	2
Setrvalé zdvojení sérového kreatininu	0	0	0	1	1	2
Terminální renální selhání	0	0	0	1	1	2

Tab.16: Renální výstupy na konci dlouhodobého sledování, pacienti co dokončili versus nedokončili protokol studie. Převzato z [178]

Vyjádřeno v absolutních počtech pacientů. Pacienti s terminálním renálním selháním jsou zahrnuti i do kategorií s mírnějším renálním postižením.

CFA, cyklofosfamid; CyA, cyklosporin A.

Většina pacientů se ještě v době prodlouženého sledování léčila alespoň kortikoidy, někteří i kombinovanou imunosupresivní léčbou, jak je znázorněno v tabulce č. 17. Po dokončení studijního protokolu či po vyloučení studie v průběhu protokolu obdrželi pacienti median 1 imunosupresivní látku. Na konci sledování bylo 47% pacientů z CFA větve vs 68% z CyA větve léčeno antihypertenzní terapií. Ve většině případů (53% všech pacientů) se jednalo o inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEI) či blokátory receptoru pro angiotenzin II (ARB). Nebyl rozdíl mezi skupinami v chronickém poškození orgánů hodnoceno SLICC DI.

Parametr	všichni (n=38)	CFA (n=19)	CyA (n=19)
Probíhající terapie glukokortikoidy	27 (71)	14 (74)	13 (68)
Probíhající imunosupresivní terapie	19 (50)	9 (47)	10 (53)
Probíhající antihypertenzní terapie	22 (58)	9 (47)	13 (68)
V mezidobí dostal imunosupresivní terapii	25 (66)	13 (68)	12 (63)
MMF*	7 (18)	4 (21)	3 (16)
AZA*	16 (42)	7 (37)	9 (47)
CyA*	8 (21)	3 (16)	5 (26)
CFA*	7 (18)	5 (26)	2 (11)
RTX*	1 (3)	1 (5)	0 (0)
Pulzy metyprednisolonu*	6 (16)	4 (21)	2 (11)
Úmrtí	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Malignity	2 (5)	0 (0)	2 (11)
Kardiovaskulární onemocnění	1 (3)	1 (5)	0 (0)
Předčasná menopauza**	1 (4)	1 (8)	0 (0)
Těhotenství**	9 (33)	6 (46)	3 (21)
Současný SLICC DI (medián, IQR)	0.0 (1.0)	0.0 (1.0)	0.5 (1.0)

Tab.17: Léčba, non-renální výstupy a chronické poškození v dlouhodobém sledování. Převzato z [178].

Čísla jsou absolutní počty pacientů (%), z těch co mají dostupná data z dlouhodobého sledování, pokud není určeno jinak.

*terapie užitá po ukončení studijního protokolu

**od ukončení studijního protokolu, % pouze v ženské části pacientů

MMF, mykofenolát mofetil; AZA, azathioprin; CyA, Cyklosporin A; CFA, Cyklofosfamid; IQR, 25 až 75 percentil; RTX, Rituximab; SLICC DI, Systemic Lupus International Collaborating Clinics Damage Index.

U dvou pacientů z CyA skupiny byla zjištěna malignita. Jednalo se o maligní melanom, bez generalizace (5 let od randomizace), v druhém případě šlo o duktální karcinom mammy (8 let od randomizace). V CFA skupině byl popsán jeden případ předčasné menopauzy a jednou šlo o tranzitorní ischemickou ataku. Nebyl rozdíl mezi skupinami v renálních a non-renálních bezpečnostních výstupech.

4.3. Diskuze k 2. části práce

CYCLOFA LUNE byla první randomizovanou studií využívající CyA jako terapii první volby v indukci remise u pacientů s proliferativními formami LN (třída III a IV). Dříve se léčba CyA objevila v randomizovaných studiích v jiných indikacích, např. u membranozní LN [155] nebo jako udržovací terapie difuzní LN [179]. Některé skupiny, včetně našeho pracoviště, publikovaly již dříve data o pacientech s LN a touto terapií v rámci nerandomizovaných studií [180-183].

V naší studii byl CyA minimálně stejně tak účinný jako CFA co se týče navození a udržení odpovědi, resp. remise.

Ve skupině léčené CyA jsme na konci indukční fáze pozorovali přechodné zhoršení renálních parametrů (vzestup sérového kreatininu, pokles GFR). Tento nález byl celkem nepřekvapivý vzhledem ke známému vasokonstrikčnímu účinku CyA na renální arterie, a tím způsobeným vzestupem krevního tlaku a poklesu renálních funkcí [184]. Avšak po snížení dávek CyA v udržovací fázi terapie již tato deteriorace renálních funkcí nebyla pozorována. Navíc pouze jeden pacient z větve CyA a 2 pacienti z CFA skupiny měli zhoršení sérového kreatininu o více než 50 $\mu\text{mol/l}$.

Na konci indukční fáze byla průměrná proteinurie signifikantně nižší v CyA skupině a téměř 2x více pacientů z CyA větve dosáhlo na konci indukce normálních hodnot proteinurie v porovnání s CFA skupinou ($p=0,06$), na konci udržovací fáze pak většina pacientů z CyA měla absenci proteinurie ($p=0,02$). I když je nutné podotknout, že ve skupině léčené CFA byly vstupní hodnoty proteinurie nesignifikantně vyšší.

Nebyl rozdíl mezi skupinami ve vývoji hladin sledovaných protilátek, anti-C1q a antinukleosomů, které na konci indukční fáze v obou skupinách poklesly, na konci sledování opět vzestoupily. Zdá se, že zvolený typ imunosupresivní terapie na vývoj protilátek neměl

vliv. V této studii jsme nepotvrdili nálezy jiných autorů, kteří pozorovali snížení hladin anti-C1q při snížení aktivity onemocnění [111].

CyA byl podobně efektivní jako CFA co se týče zlepšení nálezů močového sedimentu, sérového albuminu a ovlivnění serologických markerů. Tato velmi slibná data se potvrdila i v dlouhodobém sledování, nicméně tam vzhledem k nedostatečné regulaci terapie (retrospektivní sledování) nelze vyloučit určité zkreslení výstupů. Zajímavé by bylo ještě delší sledování k posouzení dlouhodobé suprese renální aktivity onemocnění.

Navzdory našim očekáváním se nezdálo, že by terapie CyA byla spojena s menším množstvím nežádoucích účinků. Nicméně náš soubor pacientů byl pravděpodobně příliš malý k dosažení takových závěrů. Jak jsme předpokládali, ve skupině léčené CyA bylo pozorováno ve větším množství zvýšení krevního tlaku s nutností užívání intenzivnější antihypertenzní terapie. Toto bylo pozorováno zejména v prvních měsících terapie, kdy byly dávky CyA nejvyšší. Dále pak byl popsán po jeden případ transienční ischemické ataky a jeden případ generalizovaných křečí, které sice nebyly připisovány terapii CyA, ale teoreticky mohou být způsobeny endotelovým poškozením vyvolaným CyA či elevací krevního tlaku. Více pacientů vstupně léčených CyA bylo až do poslední kontroly léčeno antihypertenzní terapií.

Relativně nízká frekvence nežádoucích účinků způsobenou toxicitou CFA mohla být způsobena nižší dávkou CFA v porovnání s dávkami užívanými dle protokolů NIH (National Institute of Health) [151] a rovněž byli vyloučeni pacienti s předchozím užíváním CFA, což snižuje jeho kumulativní dávku. CyA se zdá být bezpečnější variantou zejména z hlediska gonadotoxicity CFA a výskytu SLE a LN především v populaci mladých žen v reprodukčním věku [185]. Nicméně v našem dlouhodobém sledování měla předčasnou amenorheu pouze jedna pacientka z této skupiny a dokonce více pacientek po dokončení protokolu otěhotnělo ve větví CFA. Zajímavé je, že obě popisované malignity se vyskytly ve větví léčené CyA.

Během studie žádný pacient nezemřel. Avšak na konci sledování nemáme informace o 4 pacientech. Incidence leukopenie a infekčních komplikací se nelišila mezi oběmi skupinami.

V dlouhodobém sledování jsme posuzovali i kumulativní chronické poškození, které bylo poměrně malé a mezi skupinami se nelišilo.

K posouzení odpovědi na terapii jsme 40 pacientů vyhodnocovali v dlouhodobém sledování počet relapsů a dlouhodobý renální výstup. Mezi skupinami nebyl rozdíl, co se týče frekvence relapsů, v analýze přežití - doby bez relapsu, nebyl rozdíl ani renálními parametry. Dále jsme sledovali následující terapii, po ukončení protokolu, ani zde nebyly odlišnosti v terapii, ani v dávkách kortikoidů. Relapsy byly většinou léčeny zvýšením dávek kortikoidů anebo i.v. pulsy CFA, řidčeji MMF či CyA. I když se mezi skupinami terapie nelišily, je možné, že výběr terapie měl na výsledek vliv.

Přesto, že žádný z rozdílů mezi skupinami nebyl signifikantní, se zdá, že naše data podporují výstupy studie Euro-Lupus [186], která považuje terapii nižšími dávkami CFA za relativně bezpečnou.

Dalo by se říci, že jednou z limitací naší studie bylo omezené spektrum pacientů. Zařazení byli pacienti převážně bílé rasy, mající maximálně mírnou renální insuficienci. Tato restrikce byla provedena z důvodu potenciální renální toxicity CyA. Laboratorní vyšetření byla prováděna v jednotlivých zúčastněných centrech, proto byla data mezi sebou hůře srovnatelná, pro rozdíly v metodice, byla některá vyšetření hodnocena semikvitatativně (např. anti-dsDNA, vyšetření močového sedimentu). Hodnocení dlouhodobého výstupu bylo prováděno retrospektivně a proto mohlo být ovlivněno terapií, která nebyla po ukončení studijního protokolu jasně definována. Studijní protokol byl vytvořen v roce 2000, proto definice výstupů naší studie, inspirované kritérii dle Boumpase [187], neodpovídají současným doporučením renomovaných revmatologických a nefrologických společností. Naše kritéria byla poměrně přísná, co se týče definování remise, kde byla vyžadována naprostá normalizace močového nálezu, mírnější bylo hodnocení odpovědi na terapii splňující alespoň částečné zlepšení některých parametrů (proteinurie, močového sedimentu, složky C3 komplementu).

Jistou nevýhodou mohlo být i alternativní podávání p.o. CFA pulzů v udržovací fázi terapie, což zřejmě není tak účinné jako i.v. forma.

Dále dlouhodobé hodnocení bylo provedeno retrospektivně, ve dvou časových průřezích, lepší variantou by jistě bylo dlouhodobé prospektivní sledování.

4.4. Závěr:

V této randomizované studii se 40 zařazenými pacienty s proliferativními formami LN, kavkazské rasy, byl v dosažení primárních i sekundárních cílů CyA podobně efektivní jako CFA. Je zřejmé, že terapie CyA by neměla být používána u pacientů s arteriální hypertenzí a pokročilou renální insuficiencí. Zdá se, že terapie CyA může být srovnatelnou alternativou pro terapii proliferativních forem LN, zejména pak tam, kde jiná léčba je nevhodná, či selhala. V dlouhodobém sledování byl poměrně malý záchyt závažných nežádoucích účinků terapie a nebyl rozdíl v jejich výskytu mezi skupinami. Nebyl rozdíl mezi skupinami ve vývoji hladin komplementu, vybraných autoprotilátek, t.j. anti-C1q a antinukleosomů, je zde naznačen trend k poklesu protilátek po terapii, ale přesto u většiny pacientů zůstávají hladiny protilátek elevované. Zdá se, že výběr imunosupresivní terapie na jejich dynamiku neměl vliv.

5. Použitá literatura:

1. Moss KE, Ioannou Y, Sultan SM, Haq I, Isenberg DA: **Outcome of a cohort of 300 patients with systemic lupus erythematosus attending a dedicated clinic for over two decades.** *Ann Rheum Dis* 2002, **61**(5):409-413.
2. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Domenech I, Aydintug AO, Jedryka-Goral A, de Ramon E *et al*: **Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus.** *Medicine (Baltimore)* 1993, **72**(2):113-124.
3. Doria A, Zen M, Canova M, Bettio S, Bassi N, Nalotto L, Rampudda M, Ghirardello A, Iaccarino L: **SLE diagnosis and treatment: when early is early.** *Autoimmun Rev*, **10**(1):55-60.
4. Cutolo M, Capellino S, Sulli A, Seriola B, Secchi ME, Villaggio B, Straub RH: **Estrogens and autoimmune diseases.** *Ann N Y Acad Sci* 2006, **1089**:538-547.
5. Hochberg MC, Petri M: **Clinical features of systemic lupus erythematosus.** *Curr Opin Rheumatol* 1993, **5**(5):575-586.
6. Citera G, Wilson WA: **Ethnic and geographic perspectives in SLE.** *Lupus* 1993, **2**(6):351-353.
7. Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA: **The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth.** *Arthritis Rheum* 1995, **38**(4):551-558.
8. Tan EM: **Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology.** *Adv Immunol* 1989, **44**:93-151.
9. Clatworthy MR, Smith KG: **B cells in glomerulonephritis: focus on lupus nephritis.** *Semin Immunopathol* 2007, **29**(4):337-353.
10. Bigler C, Schaller M, Perahud I, Osthoff M, Trendelenburg M: **Autoantibodies against complement C1q specifically target C1q bound on early apoptotic cells.** *J Immunol* 2009, **183**(5):3512-3521.
11. Mevorach D: **Clearance of dying cells and systemic lupus erythematosus: the role of C1q and the complement system.** *Apoptosis*, **15**(9):1114-1123.
12. Lewkonia RM: **The clinical genetics of lupus.** *Lupus* 1992, **1**(2):55-62.
13. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, Walker A, Mack TM: **A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1992, **35**(3):311-318.
14. Clemenceau S, Castellano F, Montes de Oca M, Kaplan C, Danon F, Levy M: **C4 null alleles in childhood onset systemic lupus erythematosus. Is there any relationship with renal disease?** *Pediatr Nephrol* 1990, **4**(3):207-212.
15. Agnello V: **Complement deficiency states.** *Medicine (Baltimore)* 1978, **57**(1):1-23.
16. Roberts JL, Schwartz MM, Lewis EJ: **Hereditary C2 deficiency and systemic lupus erythematosus associated with severe glomerulonephritis.** *Clin Exp Immunol* 1978, **31**(2):328-338.
17. Petri M, Orbai AM, Alarcon GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, Bruce IN, Isenberg D, Wallace DJ, Nived O *et al*: **Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum*, **64**(8):2677-2686.
18. Cameron JS: **Clinical manifestation of lupus nephritis.** Oxford: *Oxford University Press*; 2001.

19. Doria A, Iaccarino L, Ghirardello A, Zampieri S, Arienti S, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Piccoli A, Todesco S: **Long-term prognosis and causes of death in systemic lupus erythematosus.** *Am J Med* 2006, **119**(8):700-706.
20. Cameron JS: **Lupus nephritis.** *J Am Soc Nephrol* 1999, **10**(2):413-424.
21. Hill GS, Delahousse M, Nochy D, Mandet C, Bariety J: **Proteinuria and tubulointerstitial lesions in lupus nephritis.** *Kidney Int* 2001, **60**(5):1893-1903.
22. Bertias GK, Salmon JE, Boumpas DT: **Therapeutic opportunities in systemic lupus erythematosus: state of the art and prospects for the new decade.** *Ann Rheum Dis*, **69**(9):1603-1611.
23. McCluskey RT: **Lupus nephritis In Kidney pathology.** New York: Appleton and Large; 1975.
24. Churg JS, L.H.: **Renal Disease: Classification and Atlas of Glomerular Disease.** 1982.
25. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T, Ferrario F *et al*: **The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited.** *J Am Soc Nephrol* 2004, **15**(2):241-250.
26. Dalmaso AP: **Complement in the pathophysiology and diagnosis of human diseases.** *Crit Rev Clin Lab Sci* 1986, **24**(2):123-183.
27. Najafi CC, Korbet SM, Lewis EJ, Schwartz MM, Reichlin M, Evans J: **Significance of histologic patterns of glomerular injury upon long-term prognosis in severe lupus glomerulonephritis.** *Kidney Int* 2001, **59**(6):2156-2163.
28. Dujovne I, Pollak VE, Pirani CL, Dillard MG: **The distribution and character of glomerular deposits in systemic lupus erythematosus.** *Kidney Int* 1972, **2**(1):33-50.
29. Kurien BT, Scofield RH: **Autoantibody determination in the diagnosis of systemic lupus erythematosus.** *Scand J Immunol* 2006, **64**(3):227-235.
30. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A: **Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes.** *J Exp Med* 1994, **179**(4):1317-1330.
31. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR: **Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**(7):1241-1250.
32. Munoz LE, Lauber K, Schiller M, Manfredi AA, Herrmann M: **The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity.** *Nat Rev Rheumatol*, **6**(5):280-289.
33. Hahn BH: **Antibodies to DNA.** *N Engl J Med* 1998, **338**(19):1359-1368.
34. Lewis EJ, Schwartz MM: **Pathology of lupus nephritis.** *Lupus* 2005, **14**(1):31-38.
35. Franssen JH, van der Vlag J, Ruben J, Adema GJ, Berden JH, Hilbrands LB: **The role of dendritic cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Res Ther*, **12**(2):207.
36. Rekvig OP, Putterman C, Casu C, Gao HX, Ghirardello A, Mortensen ES, Tincani A, Doria A: **Autoantibodies in lupus: culprits or passive bystanders?** *Autoimmun Rev*, **11**(8):596-603.
37. Fenton K, Fisman S, Hedberg A, Seredkina N, Fenton C, Mortensen ES, Rekvig OP: **Anti-dsDNA antibodies promote initiation, and acquired loss of renal Dnase1 promotes progression of lupus nephritis in autoimmune (NZBxNZW)F1 mice.** *PLoS One* 2009, **4**(12):e8474.
38. Zykova SN, Tveita AA, Rekvig OP: **Renal Dnase1 enzyme activity and protein expression is selectively shut down in murine and human membranoproliferative lupus nephritis.** *PLoS One*, **5**(8).

39. Deshmukh US, Bagavant H, Fu SM: **Role of anti-DNA antibodies in the pathogenesis of lupus nephritis.** *Autoimmun Rev* 2006, **5**(6):414-418.
40. Izui S, Lambert PH, Miescher PA: **Failure to detect circulating DNA--anti-DNA complexes by four radioimmunological methods in patients with systemic lupus erythematosus.** *Clin Exp Immunol* 1977, **30**(3):384-392.
41. Emlen W, Mannik M: **Clearance of circulating DNA-anti-DNA immune complexes in mice.** *J Exp Med* 1982, **155**(4):1210-1215.
42. Burny W, Lebrun P, Cosyns JP, Saint-Remy JM: **Treatment with dsDNA-anti-dsDNA antibody complexes extends survival, decreases anti-dsDNA antibody production and reduces severity of nephritis in MRLlpr mice.** *Lupus* 1997, **6**(1):4-17.
43. Berden JH, Licht R, van Bruggen MC, Tax WJ: **Role of nucleosomes for induction and glomerular binding of autoantibodies in lupus nephritis.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999, **8**(3):299-306.
44. Mannik M, Merrill CE, Stamps LD, Wener MH: **Multiple autoantibodies form the glomerular immune deposits in patients with systemic lupus erythematosus.** *J Rheumatol* 2003, **30**(7):1495-1504.
45. Nimmerjahn F, Ravetch JV: **Fcγ receptors: old friends and new family members.** *Immunity* 2006, **24**(1):19-28.
46. Yung S, Tsang RC, Sun Y, Leung JK, Chan TM: **Effect of human anti-DNA antibodies on proximal renal tubular epithelial cell cytokine expression: implications on tubulointerstitial inflammation in lupus nephritis.** *J Am Soc Nephrol* 2005, **16**(11):3281-3294.
47. Clynes R, Dumitru C, Ravetch JV: **Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis.** *Science* 1998, **279**(5353):1052-1054.
48. Cruchaud A, Chenais F, Fournie GJ, Humair L, Lambert PH, Mulli JC, Chatelanat F: **Immune complex deposits in systemic lupus erythematosus kidney without histological or functional alterations.** *Eur J Clin Invest* 1975, **5**(3):297-309.
49. Frese S, Diamond B: **Structural modification of DNA--a therapeutic option in SLE?** *Nat Rev Rheumatol*, **7**(12):733-738.
50. Ceppellini R, Polli E and Celada F: **A DNA-reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffuses.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1957, **96**:572-574.
51. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG: **Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus.** *J Clin Invest* 1966, **45**(11):1732-1740.
52. Schur PH, Sandson J: **Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus.** *N Engl J Med* 1968, **278**(10):533-538.
53. Manger K, Manger B, Repp R, Geisselbrecht M, Geiger A, Pfahlberg A, Harrer T, Kalden JR: **Definition of risk factors for death, end stage renal disease, and thromboembolic events in a monocentric cohort of 338 patients with systemic lupus erythematosus.** *Ann Rheum Dis* 2002, **61**(12):1065-1070.
54. MacGowan JR, Ellis S, Griffiths M, Isenberg DA: **Retrospective analysis of outcome in a cohort of patients with lupus nephritis treated between 1977 and 1999.** *Rheumatology (Oxford)* 2002, **41**(9):981-987.
55. Massardo L, Martinez ME, Jacobelli S, Villarroel L, Rosenberg H, Rivero S: **Survival of Chilean patients with systemic lupus erythematosus.** *Semin Arthritis Rheum* 1994, **24**(1):1-11.
56. Petri M: **Hopkins Lupus Cohort. 1999 update.** *Rheum Dis Clin North Am* 2000, **26**(2):199-213, v.

57. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, Harley JB: **Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus.** *N Engl J Med* 2003, **349**(16):1526-1533.
58. Ho A, Magder LS, Barr SG, Petri M: **Decreases in anti-double-stranded DNA levels are associated with concurrent flares in patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 2001, **44**(10):2342-2349.
59. Macanovic M, Hogarth MB, Lachmann PJ: **Anti-DNA antibodies in the urine of lupus nephritis patients.** *Nephrol Dial Transplant* 1999, **14**(6):1418-1424.
60. Bootsma H, Spronk P, Derksen R, de Boer G, Wolters-Dicke H, Hermans J, Limburg P, Gmelig-Meyling F, Kater L, Kallenberg C: **Prevention of relapses in systemic lupus erythematosus.** *Lancet* 1995, **345**(8965):1595-1599.
61. Cambridge G, Leandro MJ, Teodorescu M, Manson J, Rahman A, Isenberg DA, Edwards JC: **B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: effect on autoantibody and antimicrobial antibody profiles.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**(11):3612-3622.
62. Aarden LA, Lakmaker F, Feltkamp TE: **Immunology of DNA. I. The influence of reaction conditions on the Farr assay as used for the detection of anti-ds DNA.** *J Immunol Methods* 1976, **10**(1):27-37.
63. Smeenk RJ, van den Brink HG, Brinkman K, Termaat RM, Berden JH, Swaak AJ: **Anti-dsDNA: choice of assay in relation to clinical value.** *Rheumatol Int* 1991, **11**(3):101-107.
64. Smeenk RJ: **ds-DNA autoantibodies:** Elsevier; 1996.
65. Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A: **Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end?** *Rheumatology (Oxford)* 2007, **46**(7):1052-1056.
66. Werle E, Blazek M, Fiehn W: **The clinical significance of measuring different anti-dsDNA antibodies by using the Farr assay, an enzyme immunoassay and a Crithidia luciliae immunofluorescence test.** *Lupus* 1992, **1**(6):369-377.
67. Jaekell HP, Trabandt A, Grobe N, Werle E: **Anti-dsDNA antibody subtypes and anti-C1q antibodies: toward a more reliable diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis.** *Lupus* 2006, **15**(6):335-345.
68. Manson JJ, Ma A, Rogers P, Mason LJ, Berden JH, van der Vlag J, D'Cruz DP, Isenberg DA, Rahman A: **Relationship between anti-dsDNA, anti-nucleosome and anti-alpha-actinin antibodies and markers of renal disease in patients with lupus nephritis: a prospective longitudinal study.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**(5):R154.
69. Neogi T, Gladman DD, Ibanez D, Urowitz M: **Anti-dsDNA antibody testing by Farr and ELISA techniques is not equivalent.** *J Rheumatol* 2006, **33**(9):1785-1788.
70. Copple SS, Sawitzke AD, Wilson AM, Tebo AE, Hill HR: **Enzyme-linked immunosorbent assay screening then indirect immunofluorescence confirmation of antinuclear antibodies: a statistical analysis.** *Am J Clin Pathol*, **135**(5):678-684.
71. Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D: **Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test.** *Lupus*, **19**(8):906-912.
72. Fishelson Z, Attali G, Mevorach D: **Complement and apoptosis.** *Mol Immunol* 2001, **38**(2-3):207-219.
73. Walport MJ: **Complement. First of two parts.** *N Engl J Med* 2001, **344**(14):1058-1066.
74. Marto N, Bertolaccini ML, Calabuig E, Hughes GR, Khamashta MA: **Anti-C1q antibodies in nephritis: correlation between titres and renal disease activity and**

- positive predictive value in systemic lupus erythematosus.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**(3):444-448.
75. Gaboriaud C, Thielens NM, Gregory LA, Rossi V, Fontecilla-Camps JC, Arlaud GJ: **Structure and activation of the C1 complex of complement: unraveling the puzzle.** *Trends Immunol* 2004, **25**(7):368-373.
 76. Elward K, Griffiths M, Mizuno M, Harris CL, Neal JW, Morgan BP, Gasque P: **CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells.** *J Biol Chem* 2005, **280**(43):36342-36354.
 77. Paidassi H, Tacnet-Delorme P, Garlatti V, Darnault C, Ghebrehwet B, Gaboriaud C, Arlaud GJ, Frachet P: **C1q binds phosphatidylserine and likely acts as a multiligand-bridging molecule in apoptotic cell recognition.** *J Immunol* 2008, **180**(4):2329-2338.
 78. Ogden CA, Kowalewski R, Peng Y, Montenegro V, Elkon KB: **IGM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo.** *Autoimmunity* 2005, **38**(4):259-264.
 79. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehwet B, Fadok VA, Henson PM: **C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells.** *J Exp Med* 2001, **194**(6):781-795.
 80. Wallis R, Dodds AW, Mitchell DA, Sim RB, Reid KB, Schwaeble WJ: **Molecular interactions between MASP-2, C4, and C2 and their activation fragments leading to complement activation via the lectin pathway.** *J Biol Chem* 2007, **282**(11):7844-7851.
 81. Kazatchkine MD, Fearon DT, Appay MD, Mandet C, Bariety J: **Immunohistochemical study of the human glomerular C3b receptor in normal kidney and in seventy-five cases of renal diseases: loss of C3b receptor antigen in focal hyalinosis and in proliferative nephritis of systemic lupus erythematosus.** *J Clin Invest* 1982, **69**(4):900-912.
 82. Bao L, Osawe I, Haas M, Quigg RJ: **Signaling through up-regulated C3a receptor is key to the development of experimental lupus nephritis.** *J Immunol* 2005, **175**(3):1947-1955.
 83. Valentijn RM, van Overhagen H, Hazevoet HM, Hermans J, Cats A, Daha MR, van EL: **The value of complement and immune complex determinations in monitoring disease activity in patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1985, **28**(8):904-913.
 84. Fremeaux-Bacchi V, Weiss L, Demouchy C, Blouin J, Kazatchkine MD: **Autoantibodies to the collagen-like region of C1q are strongly associated with classical pathway-mediated hypocomplementemia in systemic lupus erythematosus.** *Lupus* 1996, **5**(3):216-220.
 85. Trendelenburg M, Schifferli JA: **[Apoptosis and C1q: possible explanations for the pathogenesis of systemic lupus erythematosus].** *Z Rheumatol* 2000, **59**(3):172-175.
 86. Botto M, Walport MJ: **C1q, autoimmunity and apoptosis.** *Immunobiology* 2002, **205**(4-5):395-406.
 87. Charles PJ: **Defective waste disposal: does it induce autoantibodies in SLE?** *Ann Rheum Dis* 2003, **62**(1):1-3.
 88. Siegert CE, Kazatchkine MD, Sjöholm A, Wurzner R, Loos M, Daha MR: **Autoantibodies against C1q: view on clinical relevance and pathogenic role.** *Clin Exp Immunol* 1999, **116**(1):4-8.
 89. Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HT, Andrews M, Carroll MC, Savill JS, Henson PM, Botto M, Walport MJ: **A hierarchical role for classical pathway**

- complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo.** *J Exp Med* 2000, **192**(3):359-366.
90. Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F, Loos M, Pandolfi PP, Walport MJ: **Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies.** *Nat Genet* 1998, **19**(1):56-59.
 91. Mitchell DA, Pickering MC, Warren J, Fossati-Jimack L, Cortes-Hernandez J, Cook HT, Botto M, Walport MJ: **C1q deficiency and autoimmunity: the effects of genetic background on disease expression.** *J Immunol* 2002, **168**(5):2538-2543.
 92. Ferry H, Potter PK, Crockford TL, Nijnik A, Ehrenstein MR, Walport MJ, Botto M, Cornall RJ: **Increased positive selection of B1 cells and reduced B cell tolerance to intracellular antigens in c1q-deficient mice.** *J Immunol* 2007, **178**(5):2916-2922.
 93. Nash JT, Taylor PR, Botto M, Norsworthy PJ, Davies KA, Walport MJ: **Immune complex processing in C1q-deficient mice.** *Clin Exp Immunol* 2001, **123**(2):196-202.
 94. Petry F: **Molecular basis of hereditary C1q deficiency.** *Immunobiology* 1998, **199**(2):286-294.
 95. Botto M: **Links between complement deficiency and apoptosis.** *Arthritis Res* 2001, **3**(4):207-210.
 96. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ: **Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis.** *Adv Immunol* 2000, **76**:227-324.
 97. Navratil JS, Watkins SC, Wisnieski JJ, Ahearn JM: **The globular heads of C1q specifically recognize surface blebs of apoptotic vascular endothelial cells.** *J Immunol* 2001, **166**(5):3231-3239.
 98. Nauta AJ, Trouw LA, Daha MR, Tijmsa O, Nieuwland R, Schwaeble WJ, Gingras AR, Mantovani A, Hack EC, Roos A: **Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation.** *Eur J Immunol* 2002, **32**(6):1726-1736.
 99. Trendelenburg M: **Antibodies against C1q in patients with systemic lupus erythematosus.** *Springer Semin Immunopathol* 2005, **27**(3):276-285.
 100. Boyajyan Anna GM, Lilit Hovhannisyan and Diana Avetyan: **Alterations in the Immune Response, Apoptosis and Synaptic Plasticity in Posttraumatic Stress Disorder: Molecular Indicators and Relation to Clinical Symptoms.** In: *New Insights into Anxiety Disorders*. Edited by Durbano F: InTech; 2013.
 101. Norsworthy P, Theodoridis E, Botto M, Athanassiou P, Beynon H, Gordon C, Isenberg D, Walport MJ, Davies KA: **Overrepresentation of the Fcγ receptor type IIA R131/R131 genotype in caucasoid systemic lupus erythematosus patients with autoantibodies to C1q and glomerulonephritis.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**(9):1828-1832.
 102. Mannik M, Wener MH: **Deposition of antibodies to the collagen-like region of C1q in renal glomeruli of patients with proliferative lupus glomerulonephritis.** *Arthritis Rheum* 1997, **40**(8):1504-1511.
 103. Trouw LA, Groeneveld TW, Seelen MA, Duijs JM, Bajema IM, Prins FA, Kishore U, Salant DJ, Verbeek JS, van Kooten C *et al*: **Anti-C1q autoantibodies deposit in glomeruli but are only pathogenic in combination with glomerular C1q-containing immune complexes.** *J Clin Invest* 2004, **114**(5):679-688.
 104. Siegert CE, Daha MR, Lobatto S, van der Voort EA, Breedveld FC: **IgG autoantibodies to C1q do not detectably influence complement activation in vivo and in vitro in systemic lupus erythematosus.** *Immunol Res* 1992, **11**(2):91-97.
 105. Bijl M, Limburg PC, Kallenberg CG: **New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis.** *Neth J Med* 2001, **59**(2):66-75.

106. Fiore N, Castellano G, Blasi A, Capobianco C, Loverre A, Montinaro V, Netti S, Torres D, Manno C, Grandaliano G *et al*: **Immature myeloid and plasmacytoid dendritic cells infiltrate renal tubulointerstitium in patients with lupus nephritis.** *Mol Immunol* 2008, **45**(1):259-265.
107. Uwatoko S, Aotsuka S, Okawa M, Egusa Y, Yokohari R, Aizawa C, Suzuki K: **Characterization of C1q-binding IgG complexes in systemic lupus erythematosus.** *Clin Immunol Immunopathol* 1984, **30**(1):104-116.
108. Wener MH, Uwatoko S, Mannik M: **Antibodies to the collagen-like region of C1q in sera of patients with autoimmune rheumatic diseases.** *Arthritis Rheum* 1989, **32**(5):544-551.
109. Braun A, Sis J, Max R, Mueller K, Fiehn C, Zeier M, Andrassy K: **Anti-chromatin and anti-C1q antibodies in systemic lupus erythematosus compared to other systemic autoimmune diseases.** *Scand J Rheumatol* 2007, **36**(4):291-298.
110. Trendelenburg M, Courvoisier S, Spath PJ, Moll S, Mihatsch M, Itin P, Schifferli JA: **Hypocomplementemic urticarial vasculitis or systemic lupus erythematosus?** *Am J Kidney Dis* 1999, **34**(4):745-751.
111. Trendelenburg M, Lopez-Trascasa M, Potlukova E, Moll S, Regenass S, Fremeaux-Bacchi V, Martinez-Ara J, Jancova E, Picazo ML, Honsova E *et al*: **High prevalence of anti-C1q antibodies in biopsy-proven active lupus nephritis.** *Nephrol Dial Transplant* 2006, **21**(11):3115-3121.
112. Moroni G, Radice A, Giammarresi G, Quaglini S, Gallelli B, Leoni A, Li Vecchi M, Messa P, Sinico RA: **Are laboratory tests useful for monitoring the activity of lupus nephritis? A 6-year prospective study in a cohort of 228 patients with lupus nephritis.** *Ann Rheum Dis* 2009, **68**(2):234-237.
113. Pickering MC, Botto M: **Are anti-C1q antibodies different from other SLE autoantibodies?** *Nat Rev Rheumatol*, **6**(8):490-493.
114. Moroni G, Trendelenburg M, Del Papa N, Quaglini S, Raschi E, Panzeri P, Testoni C, Tincani A, Banfi G, Balestrieri G *et al*: **Anti-C1q antibodies may help in diagnosing a renal flare in lupus nephritis.** *Am J Kidney Dis* 2001, **37**(3):490-498.
115. Siegert CE, Daha MR, Tseng CM, Coremans IE, van Es LA, Breedveld FC: **Predictive value of IgG autoantibodies against C1q for nephritis in systemic lupus erythematosus.** *Ann Rheum Dis* 1993, **52**(12):851-856.
116. Volanakis JE: **Human C-reactive protein: expression, structure, and function.** *Mol Immunol* 2001, **38**(2-3):189-197.
117. Bell SA, Faust H, Schmid A, Meurer M: **Autoantibodies to C-reactive protein (CRP) and other acute-phase proteins in systemic autoimmune diseases.** *Clin Exp Immunol* 1998, **113**(3):327-332.
118. Fraser DA, Laust AK, Nelson EL, Tenner AJ: **C1q differentially modulates phagocytosis and cytokine responses during ingestion of apoptotic cells by human monocytes, macrophages, and dendritic cells.** *J Immunol* 2009, **183**(10):6175-6185.
119. Sahu A, Lambris JD: **Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity.** *Immunol Rev* 2001, **180**:35-48.
120. Linares LF, Gomez-Reino JJ, Carreira PE, Morillas L, Ibero I: **C-reactive protein (CRP) levels in systemic lupus erythematosus (SLE).** *Clin Rheumatol* 1986, **5**(1):66-69.
121. Pepys MB, Lanham JG, De Beer FC: **C-reactive protein in SLE.** *Clin Rheum Dis* 1982, **8**(1):91-103.
122. Honig S, Gorevic P, Weissmann G: **C-reactive protein in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1977, **20**(5):1065-1070.

123. Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB: **C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity.** *J Exp Med* 2000, **192**(9):1353-1364.
124. Grutzmeier S, von Schenck H: **C-reactive protein-immunoglobulin complexes in two patients with macroglobulinemia.** *Scand J Clin Lab Invest* 1987, **47**(8):819-822.
125. Maire MA, Barnet M, Carpentier N, Miescher PA, Lambert PH: **Identification of components of IC purified from human sera. I. Immune complexes purified from sera of patients with SLE.** *Clin Exp Immunol* 1983, **51**(2):215-224.
126. Russell AI, Cunninghame Graham DS, Shepherd C, Robertson CA, Whittaker J, Meeks J, Powell RJ, Isenberg DA, Walport MJ, Vyse TJ: **Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus.** *Hum Mol Genet* 2004, **13**(1):137-147.
127. Berden JH: **Lupus nephritis.** *Kidney Int* 1997, **52**(2):538-558.
128. Zouki C, Haas B, Chan JS, Potempa LA, Filep JG: **Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with promotion of neutrophil-endothelial cell adhesion.** *J Immunol* 2001, **167**(9):5355-5361.
129. Motie M, Brockmeier S, Potempa LA: **Binding of model soluble immune complexes to modified C-reactive protein.** *J Immunol* 1996, **156**(11):4435-4441.
130. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW: **The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II.** *J Exp Med* 1999, **190**(4):585-590.
131. Schwedler SB, Amann K, Wernicke K, Krebs A, Nauck M, Wanner C, Potempa LA, Galle J: **Native C-reactive protein increases whereas modified C-reactive protein reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice.** *Circulation* 2005, **112**(7):1016-1023.
132. Sjowall C, Wettero J, Bengtsson T, Askendal A, Almroth G, Skogh T, Tengvall P: **Solid-phase classical complement activation by C-reactive protein (CRP) is inhibited by fluid-phase CRP-C1q interaction.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **352**(1):251-258.
133. Mihlan M, Blom AM, Kupreishvili K, Lauer N, Stelzner K, Bergstrom F, Niessen HW, Zipfel PF: **Monomeric C-reactive protein modulates classic complement activation on necrotic cells.** *FASEB J*, **25**(12):4198-4210.
134. Yang XW, Tan Y, Yu F, Zhao MH: **Interference of antimodified C-reactive protein autoantibodies from lupus nephritis in the biofunctions of modified C-reactive protein.** *Hum Immunol*, **73**(2):156-163.
135. Sjowall C, Zickert A, Skogh T, Wettero J, Gunnarsson I: **Serum levels of autoantibodies against C-reactive protein correlate with renal disease activity and response to therapy in lupus nephritis.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**(6):R188.
136. Tan Y, Yu F, Yang H, Chen M, Fang Q, Zhao MH: **Autoantibodies against monomeric C-reactive protein in sera from patients with lupus nephritis are associated with disease activity and renal tubulointerstitial lesions.** *Hum Immunol* 2008, **69**(12):840-844.
137. Kresl JJ, Potempa LA, Anderson BE: **Conversion of native oligomeric to a modified monomeric form of human C-reactive protein.** *Int J Biochem Cell Biol* 1998, **30**(12):1415-1426.
138. Sjowall C, Wettero J: **Pathogenic implications for autoantibodies against C-reactive protein and other acute phase proteins.** *Clin Chim Acta* 2007, **378**(1-2):13-23.

139. Rees RF, Gewurz H, Siegel JN, Coon J, Potempa LA: **Expression of a C-reactive protein neoantigen (neo-CRP) in inflamed rabbit liver and muscle.** *Clin Immunol Immunopathol* 1988, **48**(1):95-107.
140. Jabs WJ, Logering BA, Gerke P, Kreft B, Wolber EM, Klinger MH, Fricke L, Steinhoff J: **The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo.** *Eur J Immunol* 2003, **33**(1):152-161.
141. Diehl EE, Haines GK, 3rd, Radosevich JA, Potempa LA: **Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue.** *Am J Med Sci* 2000, **319**(2):79-83.
142. Sjowall C, Bengtsson AA, Sturfelt G, Skogh T: **Serum levels of autoantibodies against monomeric C-reactive protein are correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Res Ther* 2004, **6**(2):R87-94.
143. Figueredo MA, Rodriguez A, Ruiz-Yague M, Romero M, Fernandez-Cruz A, Gomez-de la Concha E, Patino R: **Autoantibodies against C-reactive protein: clinical associations in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome.** *J Rheumatol* 2006, **33**(10):1980-1986.
144. Sjowall C, Olin AI, Skogh T, Wettero J, Morgelin M, Nived O, Sturfelt G, Bengtsson AA: **C-reactive protein, immunoglobulin G and complement co-localize in renal immune deposits of proliferative lupus nephritis.** *Autoimmunity*, **46**(3):205-214.
145. Zuniga R, Markowitz GS, Arkachaisri T, Imperatore EA, D'Agati VD, Salmon JE: **Identification of IgG subclasses and C-reactive protein in lupus nephritis: the relationship between the composition of immune deposits and FCgamma receptor type IIA alleles.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**(2):460-470.
146. Nakahara C, Kanemoto K, Saito N, Oyake Y, Kamoda T, Nagata M, Matsui A: **C-reactive protein frequently localizes in the kidney in glomerular diseases.** *Clin Nephrol* 2001, **55**(5):365-370.
147. Sjowall C, Eriksson P, Almer S, Skogh T: **Autoantibodies to C-reactive protein is a common finding in SLE, but not in primary Sjogren's syndrome, rheumatoid arthritis or inflammatory bowel disease.** *J Autoimmun* 2002, **19**(3):155-160.
148. Chen CS, Lin JT, Goss KA, He YA, Halpert JR, Waxman DJ: **Activation of the anticancer prodrugs cyclophosphamide and ifosfamide: identification of cytochrome P450 2B enzymes and site-specific mutants with improved enzyme kinetics.** *Mol Pharmacol* 2004, **65**(5):1278-1285.
149. Colvin OM: **An overview of cyclophosphamide development and clinical applications.** *Curr Pharm Des* 1999, **5**(8):555-560.
150. Flanc RS, Roberts MA, Strippoli GF, Chadban SJ, Kerr PG, Atkins RC: **Treatment of diffuse proliferative lupus nephritis: a meta-analysis of randomized controlled trials.** *Am J Kidney Dis* 2004, **43**(2):197-208.
151. Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D, Sebastiani GD, Garrido Ed Ede R, Danieli MG, Abramovicz D, Blockmans D, Mathieu A, Direskeneli H *et al*: **Immunosuppressive therapy in lupus nephritis: the Euro-Lupus Nephritis Trial, a randomized trial of low-dose versus high-dose intravenous cyclophosphamide.** *Arthritis Rheum* 2002, **46**(8):2121-2131.
152. Houssiau FA: **Management of lupus nephritis: an update.** *J Am Soc Nephrol* 2004, **15**(10):2694-2704.
153. Burgelova M: **Imunosupresivní léčba po transplantaci ledviny-současné přístupy.** *Remedia* 2011, **21**(4):321-328.
154. Hu W, Liu Z, Shen S, Li S, Yao X, Chen H, Li L: **Cyclosporine A in treatment of membranous lupus nephropathy.** *Chin Med J (Engl)* 2003, **116**(12):1827-1830.

155. Austin HA, 3rd, Illei GG, Braun MJ, Balow JE: **Randomized, controlled trial of prednisone, cyclophosphamide, and cyclosporine in lupus membranous nephropathy.** *J Am Soc Nephrol* 2009, **20**(4):901-911.
156. Chan TM, Li FK, Tang CS, Wong RW, Fang GX, Ji YL, Lau CS, Wong AK, Tong MK, Chan KW *et al*: **Efficacy of mycophenolate mofetil in patients with diffuse proliferative lupus nephritis.** Hong Kong-Guangzhou Nephrology Study Group. *N Engl J Med* 2000, **343**(16):1156-1162.
157. Chan TM, Tse KC, Tang CS, Mok MY, Li FK: **Long-term study of mycophenolate mofetil as continuous induction and maintenance treatment for diffuse proliferative lupus nephritis.** *J Am Soc Nephrol* 2005, **16**(4):1076-1084.
158. Ginzler EM, Dooley MA, Aranow C, Kim MY, Buyon J, Merrill JT, Petri M, Gilkeson GS, Wallace DJ, Weisman MH *et al*: **Mycophenolate mofetil or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis.** *N Engl J Med* 2005, **353**(21):2219-2228.
159. Contreras G, Pardo V, Leclercq B, Lenz O, Tozman E, O'Nan P, Roth D: **Sequential therapies for proliferative lupus nephritis.** *N Engl J Med* 2004, **350**(10):971-980.
160. Appel GB, Contreras G, Dooley MA, Ginzler EM, Isenberg D, Jayne D, Li LS, Mysler E, Sanchez-Guerrero J, Solomons N *et al*: **Mycophenolate mofetil versus cyclophosphamide for induction treatment of lupus nephritis.** *J Am Soc Nephrol* 2009, **20**(5):1103-1112.
161. Dooley MA, Jayne D, Ginzler EM, Isenberg D, Olsen NJ, Wofsy D, Eitner F, Appel GB, Contreras G, Lisk L *et al*: **Mycophenolate versus azathioprine as maintenance therapy for lupus nephritis.** *N Engl J Med*, **365**(20):1886-1895.
162. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: **The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 1982, **25**(11):1271-1277.
163. Hawker G, Gabriel S, Bombardier C, Goldsmith C, Caron D, Gladman D: **A reliability study of SLEDAI: a disease activity index for systemic lupus erythematosus.** *J Rheumatol* 1993, **20**(4):657-660.
164. Gordon C, Jayne D, Pusey C, Adu D, Amoura Z, Aringer M, Ballerin J, Cervera R, Calvo-Alen J, Chizzolini C *et al*: **European consensus statement on the terminology used in the management of lupus glomerulonephritis.** *Lupus* 2009, **18**(3):257-263.
165. Rosenau BJ, Schur PH: **Antibodies to C reactive protein.** *Ann Rheum Dis* 2006, **65**(5):674-676.
166. Sjowall C, Cardell K, Bostrom EA, Bokarewa MI, Enocsson H, Ekstedt M, Lindvall L, Fryden A, Almer S: **High prevalence of autoantibodies to C-reactive protein in patients with chronic hepatitis C infection: association with liver fibrosis and portal inflammation.** *Hum Immunol*, **73**(4):382-388.
167. Vlahakos DV, Foster MH, Adams S, Katz M, Ucci AA, Barrett KJ, Datta SK, Madaio MP: **Anti-DNA antibodies form immune deposits at distinct glomerular and vascular sites.** *Kidney Int* 1992, **41**(6):1690-1700.
168. Bootsma H, Spronk PE, Ter Borg EJ, Hummel EJ, de Boer G, Limburg PC, Kallenberg CG: **The predictive value of fluctuations in IgM and IgG class anti-dsDNA antibodies for relapses in systemic lupus erythematosus. A prospective long-term observation.** *Ann Rheum Dis* 1997, **56**(11):661-666.
169. Mortensen ES, Rekvig OP: **Nephritogenic potential of anti-DNA antibodies against necrotic nucleosomes.** *J Am Soc Nephrol* 2009, **20**(4):696-704.
170. Tesar V, Hruskova Z: **Treatment of proliferative lupus nephritis: a slowly changing landscape.** *Nat Rev Nephrol*, **7**(2):96-109.

171. Enocsson H, Sjowall C, Skogh T, Eloranta ML, Ronnblom L, Wettero J: **Interferon-alpha mediates suppression of C-reactive protein: explanation for muted C-reactive protein response in lupus flares?** *Arthritis Rheum* 2009, **60**(12):3755-3760.
172. Ji SR, Wu Y, Zhu L, Potempa LA, Sheng FL, Lu W, Zhao J: **Cell membranes and liposomes dissociate C-reactive protein (CRP) to form a new, biologically active structural intermediate: mCRP(m).** *FASEB J* 2007, **21**(1):284-294.
173. Suresh MV, Singh SK, Agrawal A: **Interaction of calcium-bound C-reactive protein with fibronectin is controlled by pH: in vivo implications.** *J Biol Chem* 2004, **279**(50):52552-52557.
174. Janko C, Franz S, Munoz LE, Siebig S, Winkler S, Schett G, Lauber K, Sheriff A, van der Vlag J, Herrmann M: **CRP/anti-CRP antibodies assembly on the surfaces of cell remnants switches their phagocytic clearance toward inflammation.** *Front Immunol*, **2**:70.
175. Wettero J, Nilsson L, Jonasson L, Sjowall C: **Reduced serum levels of autoantibodies against monomeric C-reactive protein (CRP) in patients with acute coronary syndrome.** *Clin Chim Acta* 2009, **400**(1-2):128-131.
176. Hay EM, Bacon PA, Gordon C, Isenberg DA, Maddison P, Snaith ML, Symmons DP, Viner N, Zoma A: **The BILAG index: a reliable and valid instrument for measuring clinical disease activity in systemic lupus erythematosus.** *Q J Med* 1993, **86**(7):447-458.
177. Zavada J, Pesickova S, Rysava R, Olejarova M, Horak P, Hrnecir Z, Rychlik I, Havrda M, Vitova J, Lukac J *et al*: **Cyclosporine A or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis: the Cyclofa-Lune study.** *Lupus*, **19**(11):1281-1289.
178. Zavada J, Sinikka Pesickova S, Rysava R, Horak P, Hrnecir Z, Lukac J, Rovensky J, Vitova J, Havrda M, Rychlik I *et al*: **Extended follow-up of the CYCLOFA-LUNE trial comparing two sequential induction and maintenance treatment regimens for proliferative lupus nephritis based either on cyclophosphamide or on cyclosporine A.** *Lupus*, **23**(1):69-74.
179. Moroni G, Doria A, Mosca M, Alberighi OD, Ferraccioli G, Todesco S, Manno C, Altieri P, Ferrara R, Greco S *et al*: **A randomized pilot trial comparing cyclosporine and azathioprine for maintenance therapy in diffuse lupus nephritis over four years.** *Clin J Am Soc Nephrol* 2006, **1**(5):925-932.
180. Dostal C, Tesar V, Rychlik I, Zabka J, Vencovsky J, Bartunkova J, Stejskalova A, Tegzova D: **Effect of 1 year cyclosporine A treatment on the activity and renal involvement of systemic lupus erythematosus: a pilot study.** *Lupus* 1998, **7**(1):29-36.
181. Rihova Z, Vankova Z, Maixnerova D, Dostal C, Jancova E, Honsova E, Merta M, Rysava R, Tesar V: **Treatment of lupus nephritis with cyclosporine - an outcome analysis.** *Kidney Blood Press Res* 2007, **30**(2):124-128.
182. Manger K, Kalden JR, Manger B: **Cyclosporin A in the treatment of systemic lupus erythematosus: results of an open clinical study.** *Br J Rheumatol* 1996, **35**(7):669-675.
183. Tam LS, Li EK, Leung CB, Wong KC, Lai FM, Wang A, Szeto CC, Lui SF: **Long-term treatment of lupus nephritis with cyclosporin A.** *QJM* 1998, **91**(8):573-580.
184. Hansen JM, Fogh-Andersen N, Christensen NJ, Strandgaard S: **Cyclosporine-induced hypertension and decline in renal function in healthy volunteers.** *J Hypertens* 1997, **15**(3):319-326.
185. Katsifis GE, Tzioufas AG: **Ovarian failure in systemic lupus erythematosus patients treated with pulsed intravenous cyclophosphamide.** *Lupus* 2004, **13**(9):673-678.

186. Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D, Sebastiani GD, de Ramon Garrido E, Danieli MG, Abramovicz D, Blockmans D, Cauli A, Direskeneli H *et al*: **The 10-year follow-up data of the Euro-Lupus Nephritis Trial comparing low-dose and high-dose intravenous cyclophosphamide.** *Ann Rheum Dis*, **69**(1):61-64.
187. Boumpas DT, Balow JE: **Outcome criteria for lupus nephritis trials: a critical overview.** *Lupus* 1998, **7**(9):622-629.

6. Publikace

1. Publikace in extenso, které jsou podkladem disertace, jsou přiložené v závěru (příloha 1-2)

Zavada J*, Pesickova S*, Rysava R, Olejarova M, Horak P, Hrnčíř Z, Havrda M, Vitová J, Lukáč J, Rovenský J, Těžová D, Bohmova J, Zadrážíl J, Hana J, Dostál C, Tesar V. Cyclosporine A or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis: the CYCLOFA-LUNE study. *Lupus* 2010;19(11):1281-9 **IF: 2,783**

Zavada J, Pesickova SS, Rysava R, Horak P, Hrnčíř Z, Lukáč J, Rovenský J, Vitová J, Havrda M, Rychlík I, Bohmova J, Vlasáková V, Slatinská J, Zadrážíl J, Olejarova M, Těžová D, Tesar V. Extended follow-up of the CYCLOFA-LUNE trial comparing two sequential induction and maintenance treatment regimens for proliferative lupus nephritis based on cyclophosphamide or on cyclosporine A. *Lupus* 2014; 23(1):69-74 **IF: 2,783**

Pesickova SS, Rysava R, Leníček M, Vitek I, Potluková E, Hrušková Z, Jancová E, Honsová E, Zavada J, Trendelenburg M, Tesar V. Prognostic value of anti-mCRP antibodies in lupus nephritis. Odesláno do časopisu.

2. Publikace bez vztahu k tématu disertace

Vitek L, Muchová L, Jancová E, Pesickova S, Těžová D, Peterová V, Pavelka K, Tesar V. Association of systemic lupus erythematosus with low serum bilirubin levels. *Scand J Rheumatol* 2010;39(6):480-4 **IF: 2,216**

Potluková E, Jiskra J, Freiburger T, Limanová Z, Zivorová D, Malíková K, Springer D, Grodecká L, Antosová M, Telická Z, Pesickova SS, Trendelenburg M. The production of mannan-binding lectin is dependent upon thyroid hormones regardless of the genotype: a cohort study of 95 patients with autoimmune thyroid disorders. *Clin Immunol.* 2010;136(1):123-9 **IF: 3,382**

Fojtíková M, Novota P, Cejková P, Pesickova S, Těžová D, Černá M. HLA class II, MICA and PRL gene polymorphisms: the common contribution to the systemic lupus erythematosus development in Czech population. *Rheumatol Int* 2011;31(9):1195-201 **IF: 2,214**

Koenig KF, Groeschl I, Pesickova SS, Tesar V, Eisenberger U, Trendelenburg M. Serum cytokine profile in patients with active lupus nephritis. *Cytokine*, 2012;60(2):410-6 **IF: 2,518**

*považování za první spoluautory